



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM BARIÉROVÝCH A TRANSPORTNÍCH
VLASTNOSTÍ VYBRANÝCH POLYELEKTROLYTŮ V
HYDROGELOVÝCH MATRICÍCH POMOCÍ DIFÚZNÍCH
TECHNIK**

STUDY OF BARRIER AND TRANSPORT PROPERTIES OF POLYELECTROLYTES USING DIFFUSION
TECHNIQUES IN HYDROGELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristýna Micolášová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0984/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kristýna Mikolášová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Studium bariérových a transportních vlastností vybraných polyelektrolytů v hydrogelových maticích pomocí difúzních technik

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma možnosti studia reaktivity a bariérových vlastností polyelektrolytů různými technikami.
2. Výběr polyelektrolytů a vhodných difúzních sond pro realizaci difúzních experimentů.
3. Charakterizace hydrogelů s přidavkem polyelektrolytu s ohledem na transportní a bariérové vlastnosti.
4. Posouzení vlivu interakcí polyelektrolyt/difúzní sonda na finální bariérové vlastnosti hydrogelů.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kristýna Mikolášová
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium bariérových a transportních vlastností vybraných polyelektrolytů v hydrogelových maticích pomocí difúzních technik.

Studium těchto vlastností bylo prováděno v horizontálních difúzních celách, kdy je sledována změna koncentrace difúzní sondy v závislosti na čase. Difúzní experimenty byly prováděny na agarózovém hydrogelu s přidavkem alginátu, kyseliny hyaluronové, polystyrensulfonátu, huminových kyselin a jako difúzní sonda byl použit rhodamin 6G. Součástí této práce jsou dále i metody charakterizující zkoumané látky a hydrogelové matrice jako jsou např. reologie a potenciometrická titrace.

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat vliv interakcí mezi procházejícím barvivem (rhodamin 6G) a příslušným gelem (agaróza + polyelektrolyt) na fundamentální difúzní parametry (tj. efektivní difúzní koeficient, čas průchodu, aj.).

ABSTRACT

This diploma thesis was focused on study of barrier and transport properties of selected polyelectrolytes in hydrogel matrices by using diffusion techniques.

The study of these properties was performed in horizontal diffusion cells where is observed the change in diffusion probe concentration over time. Diffusion experiments were performed on an agarose hydrogel with the addition of alginate, hyaluronic acid, polystyrene sulfonate, humic acids and as a model probe rhodamine 6G was used. Important parts of this thesis are also the methods which characterize the substances and hydrogel matrices such as rheology and potentiometric titration.

The main aim of this diploma thesis was to investigate the effect of interactions between passing model dye (rhodamine 6G) and the appropriate gel (agarose + polyelectrolyte) on the fundamental diffusion parameters (effective diffusion coefficient, lag time, etc.).

KLÍČOVÁ SLOVA

huminové kyseliny, agaróza, alginát, hyaluronan, polystyrensulfonát, rhodamin 6G, hydrogel, polyelektrolyt, transportní procesy, bariérové vlastnosti

KEYWORDS

humic acids, agarose, alginate, hyaluronan, polystyrene sulfonate, rhodamine, hydrogels, polyelectrolyte, transport processes, barrier properties

CITACE

MIKOLÁŠOVÁ, K. *Studium bariérových a transportních vlastností vybraných polyelektrolytů v hydrogelových maticích pomocí difúzních technik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 88 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Bc. Kristýna Mikolášová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za odborné vedení, neustálou motivaci, cenné rady, podnětné připomínky a především za čas a bezmeznou trpělivost, kterou mi při konzultacích a zpracování této závěrečné práce věnoval.

Dále bych ráda poděkovala všem svým přátelům/kolegům za mnoho užitečných rad, hojně diskuse a pomoc při vypracování této diplomové práce.

Speciální poděkování patří mé rodině za neustálou podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu mého studia na vysoké škole.

OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	HUMINOVÉ LÁTKY.....	7
2.2	ALGINÁT	12
2.3	KYSELINA HYALURONOVÁ	15
2.4	POLYSTYRENSULFONÁT	17
2.5	GELOTVORNÁ ČINIDLA	19
2.6	DIFÚZNÍ SONDY	21
2.7	GELOVÉ SOUSTAVY.....	22
2.8	METODY CHARAKTERIZACE GELOVÝCH SOUSTAV	25
2.9	DIFÚZNÍ PROCESY	28
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	32
3.1	DIFÚZNÍ PROCESY V GELOVÝCH FÁZÍCH	32
3.2	DALŠÍ METODY PRO STUDIUM TRANSPORTNÍCH A BARIÉROVÝCH VLASTNOSTÍ	33
3.3	INTERAKCE POLYELEKTROLYTŮ S OPAČNĚ NABÍTÝMI LÁTKAMI	34
3.4	VYUŽITÍ DIFÚZNÍCH TECHNIK PRO STANOVENÍ DIFÚZNÍHO KOEFICIENTU	37
4	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	40
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	41
5.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO DIFÚZNÍ EXPERIMENTY	41
5.3	PŘÍPRAVA DIFÚZNÍCH EXPERIMENTŮ VE STOKESOVĚ DIAFRAGMOVÉ DIFÚZNÍ CELE	43
5.4	CHARAKTERIZACE ZKOUMANÝCH LÁTEK	45
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
6.1	CHARAKTERIZACE ZKOUMANÝCH LÁTEK	48
6.2	DIFÚZNÍ EXPERIMENTY	55
7	ZÁVĚR.....	68
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	70
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	77
9.1	POUŽITÉ ZKRATKY	77
9.2	POUŽITÉ SYMBOLY	78
10	PŘÍLOHY	79

1 ÚVOD

Tato diplomová práce je zaměřena na studium bariérových a transportních vlastností vybraných polyelektrolytů v hydrogelových maticích. Studium těchto vlastností bylo realizováno metodou Stokesovy horizontální difúzní cely v agarózových hydrogelech s přídavkem biopolymerů (alginát, hyaluronan), syntetických polymerů (polystyrensulfonát) nebo supramolekulárních látek (humínové kyseliny). Gelové struktury bylo využito zejména proto, že její vlastnosti nám umožňují připravit systém s námi zvolenými parametry (např. s definovanou velikostí pórů) a také proto, že vhodně simuluje reálné podmínky v přírodě. Tento fakt je nutný pro správný matematický popis probíhajících difúzních procesů. Další výhodou je také to, že lze připravit gel s přídavkem vybrané zkoumané látky, kterou jednoduše zabudujeme do gelové struktury.

Všechny zmíněné polyelektrolyty jsou hojně využívány v širokém rozmezí průmyslových aplikací. Z toho důvodu jsou poměrně důkladně prozkoumány jejich struktury (výjimku tvoří humínové kyseliny) a chemické vlastnosti. Avšak problém nastává v oblasti studia bariérových a transportních vlastností, a to z důvodu, že stále neexistuje univerzální technika pro studium interakcí zkoumaných látek s opačně nabitými substancemi. Z toho důvodu byly navrženy experimenty v difúzní cele, které jednoduše simulují přirozené podmínky v přírodě, jsou vhodně použitelné pro široké spektrum zkoumaných látek a můžeme při nich jednoduše měnit vliv základních podmínek měření, jako jsou teplota, pH, nebo i modifikace složení difúzní membrány.

Teoretická část je zaměřena na seznámení se zkoumanými látkami (základní charakteristiky a jejich obecné využití) a metodami použitými při studiu jejich transportních a bariérových vlastností. Experimentální část se poté zabývá různými druhy charakterizace zkoumaných látek (stanovení celkové kyselosti používaných látek pomocí potenciometrické titrace) a detailnějším zkoumáním hydrogelových matic – charakterizací mechanických vlastností (reologie). Použitou metodou pro samotné studium transportních a bariérových vlastností vybraných polyelektrolytů v agarózových hydrogelech je poté metoda difúzní cely. Reaktivita přírodních a syntetických polyelektrolytů byla poté popisována pomocí hodnot fundamentálních difúzních parametrů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část diplomové práce se zabývá seznámením se zkoumanými látkami, jejich strukturou, obecnými vlastnostmi a využitím. Obecně můžeme zkoumané látky rozdělit na dvě kategorie – *přírodního charakteru* (huminové látky, alginát, kyselina hyaluronová) a *syntetické látky* (polystyrensulfonyl).

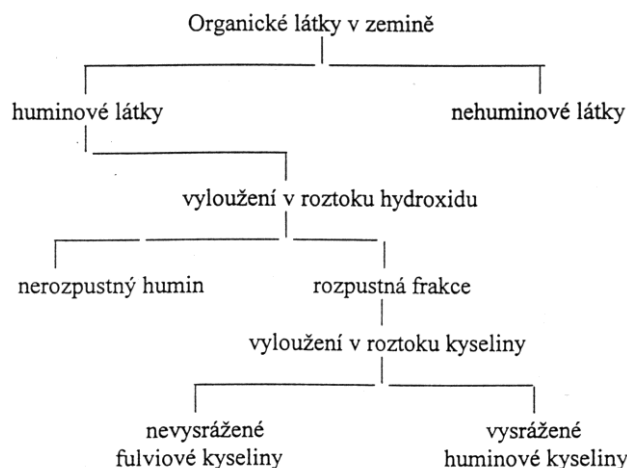
2.1 Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou přírodní organické sloučeniny, které vznikají chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty (zejména rostlin) a činností mikroorganismů. Huminové látky lze obecně rozdělit na *humínové kyseliny*, *fulvínové kyseliny* a *humín*. V přírodě se vyskytují v sedimentech, zemíně, rašelině, hnědém uhlí, lignitu a jejich množství kolísá od stopových množství (stojaté vody, písek, jíly), přes jednotky procent (běžné zeminy) až k desítkám procent (lignit, hnědé uhlí), opravdu vysoký obsah poté můžeme sledovat u rašeliny – 80 % a více. Organická složka půdy se skládá ze směsi rostlinných a mikrobiálních složek (směs rostlinných a mikrobiálních sacharidů, bílkovin, lipidů a částečně degradovaných ligninů, taninů, melaninů atd.). Představují tak nejběžnější formy organického uhlíku v přírodním prostředí. Struktura huminových látek nebyla doposud zcela objasněna, i přes tuto skutečnost je však známo, že obsahují karboxylové, fenolové, karbonylové, hydroxylové, chinonové, semichinonové, éterové, esterové, aminové, amidové a alifatické funkční skupiny. Díky svému velkému specifickému povrchu, chemické povaze a vysoké reaktivitě jsou HL velmi dobrými adsorbenty různých látek [1][2].

2.1.1 Klasifikace huminových látek

Huminové látky se podle rozpustnosti, resp. nerozpustnosti dělí na tři kategorie [2][3]:

- Fulvínové kyseliny (FK)
 - rozpustné ve vodě nezávisle na pH
 - nejsvětlejší z HL, jejich barva je světle žlutá až žlutohnědá
 - nejnižší molekulová hmotnost a nejnižší stupeň polymerace
 - obsahují vyšší podíl kyslíku (48 hm. %) než uhlíku (45 hm. %)
- Huminové kyseliny (HK)
 - nerozpustné ve vodných roztocích s $\text{pH} \leq 2$, rozpustné v alkalických roztocích
 - barva je hnědá až hnědočerná
- Huminy (HU)
 - ve vodě zcela nerozpustné, při jakémkoli pH
 - černá barva, nejvyšší stupeň polymerace, nejvyšší molekulová hmotnost (řádově zhruba 100× vyšší než u FK)
 - nejvyšší obsah uhlíku (62 hm. %) a nejméně kyslíku (30 hm. %)



Obrázek 1: Frakcionace přirozených organických látek v zeminách [4]

Chemickou strukturou jsou si jednotlivé kategorie HL velmi podobné, avšak liší se zcela zásadně ve fyzikálních a chemických vlastnostech. Tyto rozdíly popisuje tabulka (*Tabulka 1*):

Tabulka 1: Vlastnosti jednotlivých kategorií huminových látek [5]

Huminové látky				
fulvinové kyseliny		humínové kyseliny		huminy
světle žlutá	žlutohnědá	tmavě hnědá	šedočerná	černá
<div>→</div>				
nárůst intenzity zabarvení				
nárůst stupně polymerace				
2 000 Da	nárůst molekulové hmotnosti			300 000 Da
45 hm. %	nárůst obsahu uhlíku			62 hm. %
48 hm. %	pokles obsahu kyslíku			30 hm. %
1 400 mmol H ⁺ /100 g	pokles kyselosti			500 mmol H ⁺ /100 g
pokles rozpustnosti				

Viditelný rozdíl mezi jednotlivými kategoriemi HL je v jejich *molekulové hmotnosti*. FK dosahují podstatně nižších molekulových hmotností než HU, neboť jsou ve srovnání s nimi méně kondenzované (mají ve své struktuře méně aromatických jader), ale naopak mají ve své struktuře více funkčních skupin (karboxylové, fenolové, ...). Tento poznatek můžeme jednoduše shrnout: čím více je huminová látka kondenzovaná, tím více roste její molekulová hmotnost.

Dále výše zmíněná tabulka poukazuje na fakt rozdílného *zastoupení uhlíku a kyslíku* u jednotlivých kategorií. FK mají nižší procentuální obsah uhlíku než HU, což je způsobeno nižším zastoupením aromatických jader v jejich struktuře. Naopak FK mají vyšší obsah kyslíku než HU, což je způsobeno vyšším zastoupením karboxylových skupin, které mají za následek i celkově vyšší kyselost.

Co se týče jejich rozpustnosti, jak už bylo zmíněno, tak FK a HK jsou rozpustné v zásaditém prostředí. HK nejsou rozpustné v kyselém prostředí, neboť to nedovoluje právě jejich struktura – karboxylové a fenolové funkční skupiny jsou naprotonizovány. Když budeme

zvyšovat pH, dojde nejprve k disociaci karboxylových a poté také fenolových skupin. Rozpustnost HK je tedy úzce spojena s mírou disociace funkčních skupin.

2.1.2 Struktura huminových látek

Struktura HL je obecně velice složitá, a proto je velmi obtížné ji přesně definovat. V minulosti se objevilo více pokusů o rozluštění jejich charakteristické struktury. V současnosti existuje mnoho studií zabývajících se touto problematikou, a to hlavně z důvodu značného pokroku a vývoje nových metod a postupů, které se používají na určení přesné struktury látek. Otázka absolutní struktury HL je velmi diskutabilní, protože se jedná o heterogenní směs látek, jejichž složení závisí na zdroji, metodách izolace i stanovení a dalších parametrech [6].

Základními stavebními prvky HL jsou uhlík a kyslík. Prvkové zastoupení ve FK a HK je znázorněno v tabulce (*Tabulka 2*). Zbytkový obsah představují především *vodík*, *dusík*, *síra* (až 3,5 hm. %), případně *fosfor* (až 3 hm. %) [7].

Tabulka 2: Prvkové zastoupení ve fulvinových a huminových kyselinách v hmotnostních procentech [7][8]

prvkové složení [hm. %]	fulvinové kyseliny	huminové kyseliny
uhlík	40,7–50,6	53,8–58,7
kyslík	39,7–49,8	32,8–38,3
vodík	3,8–7,0	3,3–6,2
dusík	0,9–3,3	0,8–4,3

Pro primární chemickou strukturu HL je charakteristická přítomnost funkčních skupin karboxylových, hydroxylových a methoxylových. Tyto skupiny jsou vázány jak na aromatických jádrech, tak i na postranních řetězcích. HL se od sebe liší právě zastoupením funkčních skupin. Průměrné zastoupení klíčových funkčních skupin v HL udává tabulka (*Tabulka 3*) [9].

Tabulka 3: Průměrné zastoupení funkčních skupin v FK a HK v mmol/g [9]

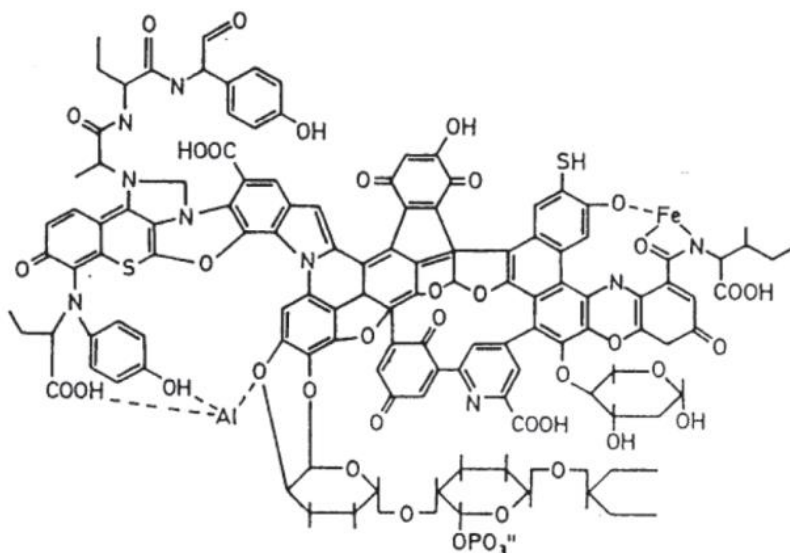
Funkční skupiny		fulvinové kyseliny [mmol/g]	huminové kyseliny [mmol/g]
karboxylová (–COOH)		2,1	4,4
hydroxylová	alkoholová (–OH)	3,9	3,3
	fenolová –OH (–R)	4,0	1,9
keto (–C=O)		1,4	1,2
methoxylová (–O–CH ₃)		0,4	0,3

Karboxylové a hydroxylové skupiny jsou příčinou kyselosti a výměnné kapacity HL pro různé kationty. Karboxylové skupiny mají silně kyselý charakter, kdežto hydroxylové skupiny jsou jen slabě kyselé. Tyto dvě skupiny včetně skupiny methoxylové vedou ke slabě polárnímu charakteru HL a zejména pak přítomnost chinoidních struktur spolu s –OH skupinami dává HL jejich charakteristické oxidačně-redukční vlastnosti.

Dalším důležitým strukturním rysem HL je fakt, že mají ve své molekulové struktuře zabudovány jak hydrofobní, tak hydrofilní oblasti, a proto mohou tvořit intra – a intermolekulární micelární útvary a mohou být adsorbovány na povrchu mnohých částic.

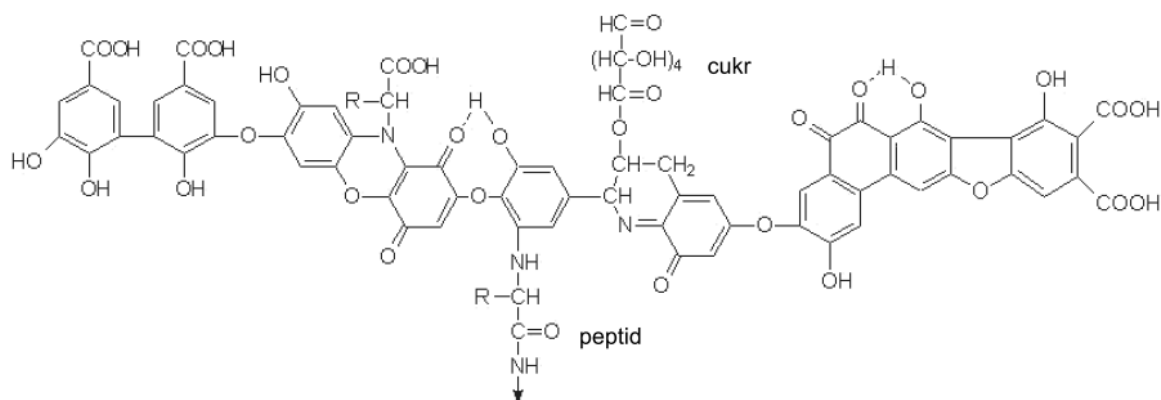
V důsledku toho mají vliv na takové procesy jako je jejich rozpustnost, koagulační chování a růst krystalů rozpuštěných látek [9][10][11].

Akceptovatelným modelem HK byl v dřívějších dobách model dle Kickutha (*Obrázek 2*). Ten uvažoval, že HK zaujímají konformaci různého tvaru a velikosti podle vlastností okolního prostředí. např. v zásaditém prostředí byl předpokládán protáhlý tvar polymerního klubka (*neboť dochází k disociaci karboxylových skupin*), naproti tomu v silně kyselém prostředí byl předpokládán klubkovitý tvar (*neboť dochází k protonizaci a následnému vysrážení HK z roztoku*) [12].



Obrázek 2: Hypotetická struktura HK dle Kickutha (1976) [12]

Obrázek 3 představuje hypotetickou strukturu huminové kyseliny podle Stevensona, kde jsou HK obecně považovány za komplexní aromatické makromolekuly. Spojení aromatických jader je v jejich struktuře zajištěno aminokyselinami, aminocukry, peptidy a alifatickými sloučeninami. Hypotetická struktura obsahuje volné a vázané fenolické skupiny, chinonové struktury, dusíkové a kyslíkové atomy ve funkci můstků a karboxylové skupiny umístěné na aromatických kruzích. HK vykazují polyaniontový charakter a mohou vázat ionty různými (*jak chemickými, tak fyzikálními*) mechanismy [2].



Obrázek 3: Hypotetická struktura HK podle Stevensona (1982) [10]

2.1.3 Vazebné možnosti huminových látek

Abychom mohli plně využít potenciálu HL, je pro nás velmi důležité znát jejich chemickou povahu. Na základě dostupných informací můžeme předpokládat několik typů vazebných interakcí mezi HL a cizorodými látkami [2][13]:

- *Iontová vazba* – vychází z působení elektrostatických sil mezi některými funkčními skupinami a ionty vyskytujícími se v roztoku. Vznik tohoto typu vazby můžeme předpokládat u interakcí HL s alkalickými kovy.
- *Koordinační vazba* – jde o nejdůležitější typ vazebné interakce mezi makromolekulární matricí HL a ionty kovů (z hlediska imobilizace toxických kovů). Tato vazba je tvořena hlavně karboxylovými a fenolickými skupinami ve struktuře HL a je výrazně ovlivněna hodnotou pH (ve slabě kyselém prostředí se na této vazbě podílí karboxylové skupiny, v zásaditém prostředí potom i skupiny fenolické). Stabilita vznikajících komplexů se vzrůstajícím pH obecně stoupá, a to zejména u těch iontů, které tvoří silné karboxylát-fenolické komplexy (např. Cu^{2+}).
- *Kovalentní vazba* – u HL jde především o interakce mezi kontaminantem a HL. Může jít o reakce probíhající bez využití enzymů nebo reakce s využitím biokatalyzátorů. Možnost vzniku kovalentní vazby mezi makromolekulární strukturou HL a kontaminantem je z praktického hlediska předpokladem pro jeho imobilizaci. K trvalé fixaci dochází vznikem kovalentní vazby např. u antracenu a HL v půdách znečištěných polyaromáty. Je ovšem důležité si zjistit, zda je proces vzniku kovalentní vazby reverzibilní nebo ireverzibilní.
- *Vodíkové můstky* – poměrně slabá vazba, která vzniká na základě přítomnosti některých funkčních skupin (amidová, laktamová, nitrilová). Tyto vazby se i přes svou nízkou vazebnou energii mohou značně podílet na vazebných schopnostech mezi huminovými látkami a kontaminanty.
- *Hydrofóbní interakce* – nejčastěji předpokládaná vazebná interakce HL s hydrofóbními a alifatickými kontaminanty. Tyto interakce vznikají při kontaktu nepolárních skupin (alkylových) nesených molekulami, které se nacházejí ve vodném roztoku a je možné je využít při imobilizaci S-triazinových herbicidních látek.

2.1.4 Využití huminových látek

Huminové látky jsou přirozenou součástí potravního řetězce a hrají důležitou úlohu v přenosu minerálů a živin uvnitř živého organismu. V rámci hierarchie nebezpečných látek jsou klasifikovány jako netoxické. Nejsou známy žádné vedlejší účinky a nezpůsobují alergické reakce. Nevykazují žádné zjevné karcinogenní a embryotoxické vlastnosti, nejsou teratogenní ani mutagenní [1].

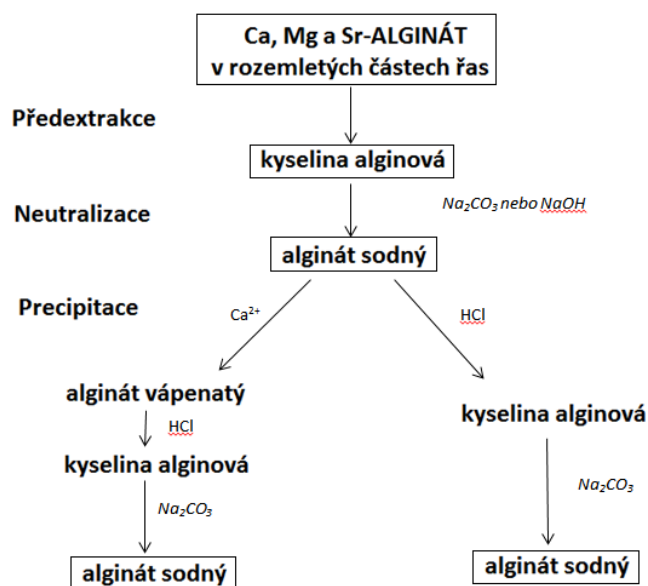
V současnosti mají široké spektrum využití, které můžeme rozdělit na tato odvětví [1][2][14]:

- aplikace v zemědělství
 - především jako aditivum k běžně používaným hnojivům (draselné a sodné humáty), neboť podporují příjem makro- (N, P, K) a mikroelementů (Fe, Zn a jiné), vážou toxické látky a tím brání jejich kumulaci v rostlinách

- pozitivní vliv na fotosyntézu (zvyšují adsorpci fotonů a uvolňují CO₂ z uhličitánů)
- přísada do krmiv pro hospodářská zvířata (pozitivní vliv na růst a váhu dobytka, protože mají stimulační účinek na trávení a využití živin)
- průmyslové použití
 - izolace HL z hnědého uhlí, lignitu nebo rašeliny
 - využití jako palivo
 - stavebnictví – plniva do cementů
- využití v oblasti ochrany životního prostředí
 - vhodné sorpční, iontově výměnné a biodegradační procesy
 - fungují v půdě jako filtr pro těžké kovy a další toxické sloučeniny (mykotoxiny, polychlorované bifenylly, dioxiny atd.), kterým tak zabraňují v přechodu do rostlin a dále do potravního řetězce
- použití ve veterinární a humánní medicíně
 - materiály s protizánětlivým účinkem s obsahem HL (lokální léčba kožních onemocnění, bahenní koupele)
 - HL napomáhají rychlejšímu léčení různých zranění a zánětů pohybového aparátu u koní (neovlivňují srážlivost krve, krvácivost, počet krevních destiček a červených krvinek a neovlivňují hladinu hemoglobinu)
 - HL zvyšují propustnost buněčné stěny, což dovoluje snadnější přenos minerálních látek z krve do kostí a buněk
 - HL přidané do potravy mohou stimulovat mikrobiální růst, současně však disponují i antimikrobiálními vlastnostmi, uvnitř organismu povzbuzují růst „dobrých“ mikroorganismů a potlačují růst „škodlivých“ mikroorganismů
 - zvyšují aktivitu imunitního systému
 - antivirové vlastnosti (vazba HL na bílkoviny virového obalu => zabránění množení viru), vliv na funkci jater (povzbuzují buněčné dýchání, aktivují metabolismus, zlepšují ochranu před poškozením), detoxikační vlastnosti (otrava těžkými kovy), ...

2.2 Alginát

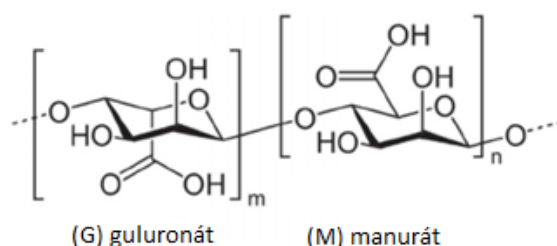
Alginát (ALG) je přírodní lineární polysacharid, který se běžně vyskytuje v buněčné stěně hnědých mořských řas (*Phaeophyceae*), kde tvoří spolu s ionty Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺ nebo Ba²⁺ až 40 % mezibuněčné hmoty ve formě gelu. Alginát může být dále produkován i některými půdními bakteriemi jako jsou například *Azotobacter vinelandii* a *Pseudomonades*, avšak extrakce z nich je velmi ekonomicky nevýhodná, proto stále převyšuje extrakce z mořských řas [15].



Obrázek 4: Schéma izolace alginátu z hnědých mořských řas [15]

Když se zaměříme na jeho strukturu, je tvořen dvěma základními složkami – β -D-manurátem (M) a α -L-guluronátem (G), které jsou vzájemně spojeny β -1-4 glykosidickou vazbou. V řetězci alginátu se střídají různě dlouhé úseky obsahující pouze molekuly M, úseky tvořené výhradně molekulami G a smíšené úseky MG. Zastoupení a střídání obou složek je velice variabilní a závisí především na původu alginátu [16].

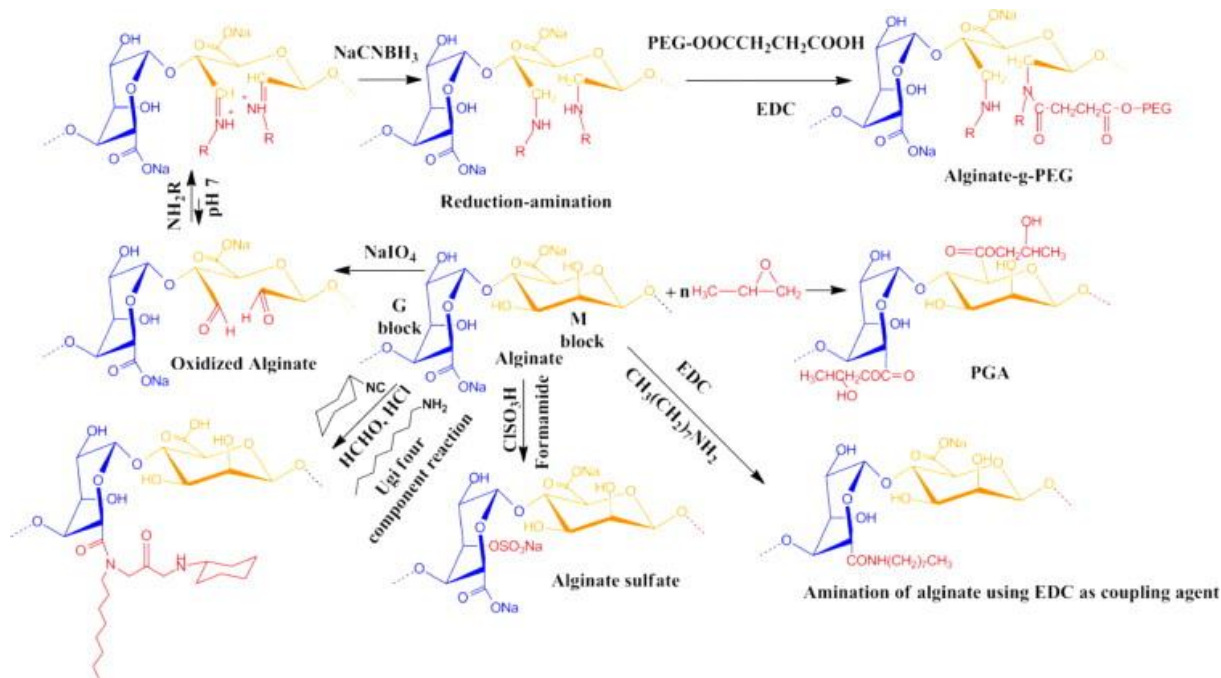
Alginát se běžně dodává v širokém rozsahu průměrných molekulových hmotností (50 - 100 000 jednotek) ve formě sodných či draselných solí, které jsou poměrně dobře rozpustné ve vodě, na rozdíl od vápenatých solí alginátu, které jsou nerozpustné ve vodě. Rozpustnost všech solí alginátu je značně omezena v ostatních rozpouštědlech (ethanol, éter apod.) a je ovlivňována hodnotou pH, iontovou silou a druhem iontů. Alginát je schopen s vícevalentními ionty kovů tvořit poměrně stabilní gel. Schopnost gelace je významnou měrou ovlivněna poměrem M a G podjednotek [17].



Obrázek 5: Strukturní vzorec alginátu [18]

Karboxylové a hydroxylové skupiny v řetězci alginátu umožňují různé modifikační přístupy ke zvýšení nebo přizpůsobení vlastností (*fyzikálně-chemických, biologických, mechanických a dalších požadovaných vlastností*). Mezi modifikace patří například roubované kopolymerace, zesílení s polyvalentními kationty nebo kationtovými polymery, oxidace, sulfatace, a esterifikace zaměřené na hydroxylové, karboxylové a také aldehydové skupiny. Esterifikace jako jednoduchá metoda k zavedení alkylové skupiny na hlavní řetězci alginátu (*reakce s alkylhalogenidy*). Nicméně, částečné nebo úplné substituce karboxylových skupin po esterifikaci mohou mít za následek sníženou schopnost gelace, což je nejatraktivnějším

rysem alginátu. Oxidace alginátu jodistanem sodným, který zavádí nové reaktivní skupiny, je alternativní přístup pro zachování jeho gelační schopnosti. Oxidovaný alginát je slibným materiálem se zlepšením biologické rozložitelnosti (v důsledku přítomnosti více reaktivních skupin, které přispívají k rychlejší degradaci) při použití v řízeném uvolňování léčiv a ve tkáňovém inženýrství [19][20].



Obrázek 6: Chemické modifikace alginátu [19]

2.2.1 Využití alginátu

Polysacharidy v řasách přilákaly rostoucí zájem o využití vzhledem k jejich vynikajícím fyzikálním vlastnostem, jako je zahušťování, schopnost gelace, stabilizační schopnosti, a také vzhledem k jejich prospěšné biologické aktivitě (antikoagulační, antitrombotické, antioxidační, antivirové, protizánětlivé, protinádorové schopnosti) [19].

Aplikace alginátu je velice závislá na jeho vlastnostech, jako jsou například [21]:

- při rozpuštění sodných/draselných solí alginátu v roztoku se výrazně zvýší viskozita výsledného roztoku
- jednoduše tvoří gel po přidání vápenatých iontů (vápník je dvojmocný a tím pádem může fungovat jako síťovací činidlo na rozdíl od sodíku či draslíku, které jsou jednomocné)
- je schopen vytvářet tenké filmy případně alginátová vlákna

Má široké uplatnění v *potravinářském průmyslu* – v koncentraci 0,25-0,5 % se využívá jako zahušťovadlo v džemech, dezertech a omáčkách, dále jako stabilizátor výrobků, které prochází velkým teplotním šokem, jako jsou zmrzliny, dále jako emulgátor pro zlepšení konzistence (pečiva, omáček, dresinků, zmrzlin, ovocných džusů a mnoha dalších potravin) a také jako imobilizační prostředek v oblasti mlékárenství [20][22].

Dále se používá v *textilním průmyslu* k barvení. Jeho hlavní funkcí je působit jako ztužovač past obsahujících reaktivní barviva. Rozdíl oproti jiným ztužovačům je v tom, že alginát nereaguje s reaktivními barvivy, a tím není snižována barvicí schopnost [23].

Další rozsáhlou kapitolu využití alginátu tvoří *biomedicínské a farmaceutické aplikace*. Alginát má řadu příznivých vlastností požadovaných v biomateriálech. V první řadě se alginát využívá na urychlení rozpouštění a vstřebávání účinné látky v léčivu (aditivum). Dále je využíván jako ochrana žaludku před překyselením (schopnost tvořit gelovou vrstvu na povrchu žaludku). Těchto gelotvorných a ztužovacích schopností je často využíváno také v *kosmetickém průmyslu*. Alginát je dále běžně používán ve tkáňovém inženýrství jako materiál pro přípravu scaffoldů (regenerace chrupavky) nebo pro distribuci léčiv [24][25].

2.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HyA) se přirozeně vyskytuje u obratlovců prakticky ve všech tkáních, kde nachází široké uplatnění v biologických funkcích. Vzhledem k výskytu látky v živých organismech (při biologickém pH 7,4) jako polyaniontu a ne ve formě protonované kyseliny je více využíván název hyaluronan. Záporný náboj vzniklý z disociované karboxylové skupiny se kompenzuje kationty – hlavně Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} [26].

Aktivita hyaluronanu v organismu je silně závislá na molekulové hmotnosti. Obecně se dá říci, že vysokomolekulární hyaluronan (nad 1 000 kDa) nejeví v organismu prakticky žádnou aktivitu ve smyslu regulace pochodů a slouží převážně jako strukturní jednotka. Oproti tomu nízkomolekulární hyaluronan (pod 100 kDa) má vliv na různé pochody v tkáních a buňkách. Dokonce bylo prokázáno, že čím je nižší molekulová hmotnost, tím je vyšší biologická aktivita [27].

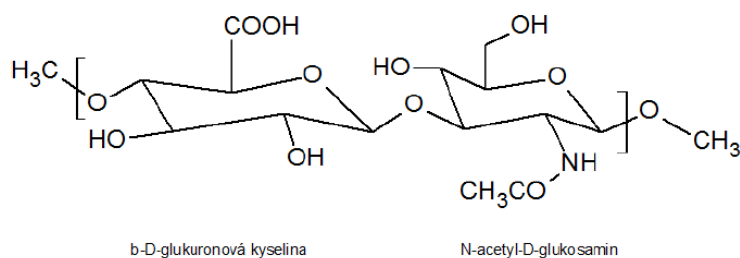
Hyaluronan je produkován hyaluronan syntázou, která je lokalizována v membráně buněk a je enzymem mnoha buněk organismu obratlovců. Jako takové jsou to zejména fibroblasty a krevní destičky, které se zapojují do tvorby extracelulární matrix (ECM) [27]. Ve výrobním procesu mohou HyA produkovat geneticky změněné kmeny bakterií *Escherichia coli*. Dalším užívaným způsobem biotechnologické výroby je získávání HyA z buněčných stěn bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus* [28].

2.3.1 Struktura a vlastnosti

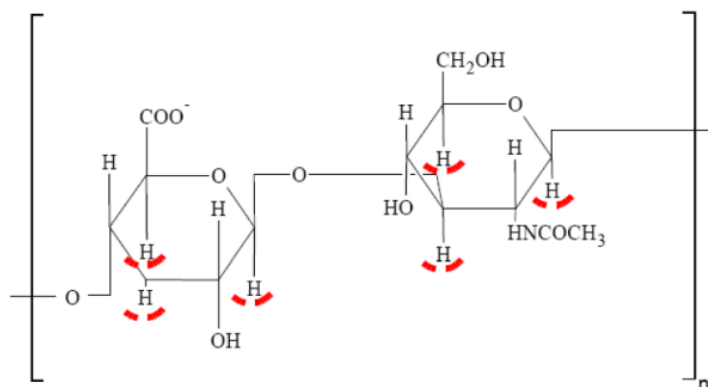
Kyselina hyaluronová je polysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Jejich typickým znakem je struktura tvořená z neustále se opakujících disacharidických jednotek. V případě hyaluronanu se opakující disacharidická jednotka skládá z monosacharidu *kyseliny glukuronové*, která je glykosidickou vazbou β -1,3 spojena s dalším monosacharidem *N-acetyl-D-glukosaminem*. Jednotlivé disacharidické jednotky jsou pak pospojovány v polymer β -1,4 glykosidickými vazbami [27]. Počet těchto podjednotek se může pohybovat ve stovkách až deseti milionech. Společně tvoří jednu strukturní jednotku celého polymeru. Oba monosacharidy, které tvoří HyA (*Obrázek 7*), prostorově vycházejí z glukózy, která v β -konfiguraci dovoluje všem objemným skupinám (hydroxylové, karboxylové, acetamidové) být ve stericky příznivé ekvatoriální pozici, zatímco všechny malé atomy vodíku zaujímají méně stericky příznivé axiální polohy (*Obrázek 8*), a proto je struktura disacharidu energeticky velmi stabilní. Axiální vodíky tvoří nepolární a poměrně hydrofobní oblasti, zatímco ekvatoriální část řetězce tvoří polárnější, hydrofilnější oblasti. Pomocí nukleární magnetické

rezonance bylo zjištěno, že každá disacharidová jednotka je vůči další jednotce otočená o 180° . Dvě disacharidové jednotky tedy dávají otočení o 360° a struktura se vrací do své původní podoby. Ve struktuře HyA připadá na jednu disacharidovou skupinu jedna karboxylová, a proto má HyA při neutrálním pH záporný náboj [29].

Ze struktury hyaluronanu lze odvodit, že se jedná o polymer, který je díky velkému množství hydroxylových skupin ve své struktuře schopen na sebe vázat velké množství vody. Obecně se dá říci, že čím je koncentrace hyaluronanu vyšší, tím je jeho roztok ve vodě viskóznější. Ve vodě je poměrně dobře rozpustný díky nábojové repulsi vyvolané karboxylovými skupinami disociovanými při pH hodnotě existující ve fyziologické tkáni [27][30].



Obrázek 7: Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové [27]



Obrázek 8: Podtržené axiální vodíky ve struktuře HyA tvoří hydrofobní část [29]

Pro dosažení požadovaných vlastností (biologická aktivita výsledného materiálu, požadovaná hydrofobicita) a tím pádem pro různé biologické aplikace je chemická modifikace HyA nezbytná. Ve struktuře HyA existují 3 cílené lokality, které jsou k dispozici pro případné chemické modifikace – karboxylové skupiny, primární a sekundární hydroxylové skupiny a N-acetylové skupiny. Obecně se dá říct, že modifikace cílené na karboxylovou skupinu zahrnují amidace, Ugi kondenzace a esterifikace. Mohou reagovat buď jako elektrofilny nebo jako nukleofily za vzniku esterů (např. tvorba benzylesteru zvyšuje hydrofobicitu a biodegradabilitu materiálu). Modifikace směřované na hydroxylové skupiny ve struktuře HyA (jak na primární, tak na sekundární) zahrnují zejména esterifikace, etherifikace a selektivní oxidace). Modifikace na N-acetylovou skupinu je obtížné provádět přímo, proto je často nutné provést deacetylaci pro obnovu reaktivní aminoskupiny, která může podléhat amidaci nebo redukční amidaci s aldehydy [19].

2.3.2 Využití kyseliny hyaluronové

HyA má široké praktické využití (buněčná biologie, kosmetika, chirurgie, imunologie, farmaceutika atd.), neboť nezpůsobuje alergické reakce a negativní odezvy imunitního systému. Naopak je zcela biologicky odbouratelná a její metabolické deriváty taktéž nepředstavují zátěž pro organismus. Sama kyselina hyaluronová je silně hygroskopická a dokáže na sebe vázat vodu až do tisícinásobku vlastní hmotnosti [31].

Příklady využití kyseliny hyaluronové:

- léčba popálenin a kožních vředů [32]
- léčba pohybového aparátu [33]
- oční chirurgie (ochrana očních tkání při nitroočních operacích, lubrikační látka v očních kapkách nebo roztocích na kontaktní čočky) [32]
- augmentace v plastické chirurgii (vyplň vrásek, vtažených jizev, zvětšení prsou) [34]
- hojení ran, v kombinaci s jódem při hojení chronických ran, diabetických nohou a bércových vředů (např. přípravek Hyiodine od firmy Contipro Pharma, a.s.) [35]
- veterinární medicína, (léčba nemocí kloubů koní, psů a koček) [36]
- cílená distribuce léčiv do tkání organismů, kde se hyaluronan samovolně koncentruje. Při cílené distribuci léčiv je léčivo zabudováno do struktury nosiče a je dopraveno až k postižené tkáni. Uvolnění léčiva je poté provedeno například ultrazvukem, změnou teploty nebo pH [37][38]

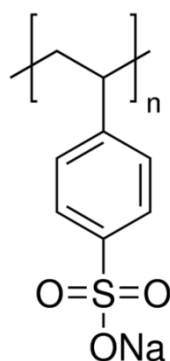
2.4 Polystyrensulfonát

Polystyrensulfonát (PSS) patří mezi záporně nabitě syntetické iontové polymery, které jsou odvozeny od polystyrenu, ale obsahují ve své struktuře sulfonové funkční skupiny. Nutno říci, že PSS není na rozdíl od ostatních zmíněných biopolymerních látek přírodního charakteru. Jedná se o synteticky vytvořenou látku, která se běžně nevyskytuje v přírodě. Tento polyanion (*v roztoku disociuje*) je dobře rozpustný ve vodě a nerozpustný v nižších alkoholech. Obvykle má podobu bílého prášku, případně je mírně nažloutlý (z důvodu jiného způsobu výroby, což nemá vliv na jeho fyzikální vlastnosti) [39][40].

PSS jako zástupce syntetických polymerů byl pro tuto diplomovou práci zvolen z důvodu, že se v praxi využívá jako modelové polymerní činidlo. Neboť se jedná o polyanion, bylo pro studium reaktivity zvoleno kationaktivní barvivo (rhodamin 6G), u kterého se předpokládá pozitivní interakce se záporně nabitým PSS.

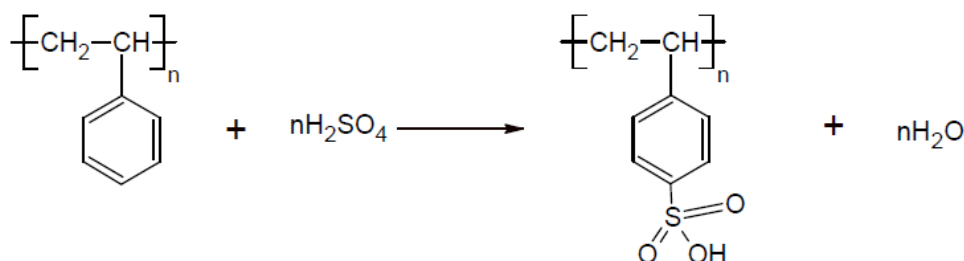
2.4.1 Struktura a vlastnosti

Polystyrensulfonát ve formě sodné soli (NaPSS) je záporně nabitý polymer, jenž bývá používán jako model flexibilního polyaniontu pro složitější polymery, které se vyskytují v přírodě. Je to typ polymeru založený na polystyrenu, konkrétně sodné soli polystyrensulfonové kyseliny. NaPSS tvoří v roztoku dlouhé, natažené řetězce, jehož centrální část tvoří vinylové jednotky, zatímco sulfonové skupiny směřují do prostoru. Běžně se molekulová hmotnost solí PSS pohybuje v rozmezí 10^4 – 10^6 Da [41]. Struktura NaPSS je uvedena na obrázku (Obrázek 9) [42].

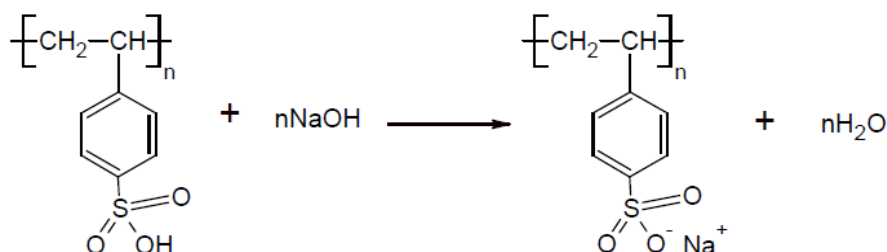


Obrázek 9: Strukturní vzorec polystyrensulfonyátu sodného [42]

Polystyrensulfonyát sodný může být připraven polymerizací či kopolymerizací styrensulfonyátu sodného nebo sulfonyací polystyrenu (*Obrázek 10*). Tvrdé podmínky použité při této přípravě vedou k celé řadě vedlejších reakce. Sodná sůl polystyrensulfonyátu je pak připravována neutralizací vzniklého polystyrensulfonyátu s hydroxidem sodným dle schématu na obrázku (*Obrázek 11*) [17].



Obrázek 10: Vznik polystyrensulfonyátu sulfonyací polystyrenu [17]



Obrázek 11: Vznik polystyrensulfonyátu sodného neutralizací polystyrensulfonyátu s hydroxidem sodným [17]

2.4.2 Využití polystyrensulfonyátu

Využití PSS je na základě jeho struktury patrné na první pohled. Bývá hojně využíván na iontovou výměnu do iontoměničových chromatografických kolon, např. NaPSS se používá jako činidlo pro změkčování tvrdé vody, neboť tvrdá voda obsahuje Ca^{2+} nebo Mg^{2+} ionty a těchto iontů může být zbavena, když se přefiltruje přes síto, které obsahuje NaPSS. Při přefiltrování dochází k iontové výměně, Ca^{2+} nebo Mg^{2+} ionty jsou imobilizovány volnými sulfonynými skupinami a Na^+ ionty prochází přes síto společně s vodou [43].

Dále se hojně využívá v lékařství pro snižování nebezpečně vysoké hladiny draslíku v krvi, tzv. *hyperkalemii*. Ta může způsobit srdeční arytmií, v krajních případech také smrt. Polystyrensulfonyát vápenatý (CaPSS) má schopnost K^+ ionty měnit za Ca^{2+} ionty, které má

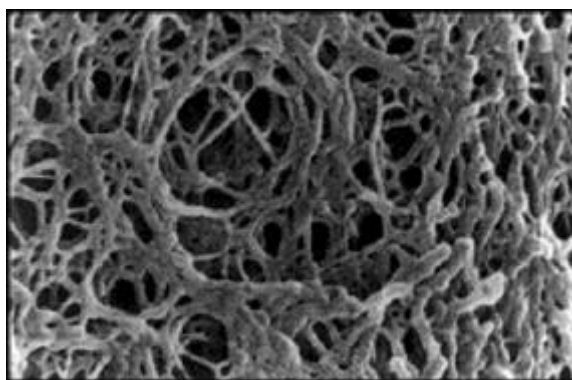
zabudovány ve své struktuře. Kromě snižování hladiny draslíku napomáhá CaPSS snižování hladiny lithia a hormonu štítné žlázy tyroxinu. Doposud se neprokázalo, že by PSS byl karcinogenní, či mutagenní [39][40].

2.5 Gelotvorná činidla

2.5.1 Agaróza

Agaróza (AG) je lineární termoreverzibilní polysacharid, který může být připraven s vysoce stálými vlastnostmi. Je v podstatě chemicky inertní a tvoří čiré hydrogely. AG je tvořena opakujícími se jednotkami agarobiózy, ta je složena z galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy [44]. Agaróza je vhodná ke studiu vlastností mnoha látek, a to hlavně díky její dobré optické průchodnosti. Další výhodou je, že je prakticky nenabitá. Díky tomu můžeme předpokládat její nízkou afinitu k ostatním použitým látkám a tím pádem nedochází k negativnímu ovlivňování experimentů. Agaróza se v přírodě vyskytuje ve formě agaru, který je součástí buněčné stěny mořských řas typu *Agarophyte* [44].

Na trhu se vyskytuje mnoho druhů komerčně dodávané agarózy. Rozdílné vlastnosti agarózy mají poté různé aplikační uplatnění. Jedním z hlavních charakterizačních parametrů je u jednotlivých typů agarózy teplota tání. Některé druhy, označované jako agarózy s nízkou teplotou tání (*low-melting-point agarose*) jsou v roztocích rozpustné při teplotě přibližně 35 °C, existují také agarózy s ultra nízkou teplotou gelace (*ultra-low-gelling temperature agaroses*), které podléhají gelaci již při 8 až 15 °C. Naopak agaróza s vysokou teplotou gelace (*high-gelling-temperature agarose*) je rozpustná až při teplotě přesahující 95 °C. Běžně používané druhy agarózy jsou však rozpustné při teplotě 85 °C. Při následném chlazení roztoku agarózy na teplotu nižší než 40 °C (u *high gelling temperature* nižší než 42 °C) opětovně vytváří gelovou strukturu. Teplota gelace je však silně závislá na množství sulfátových a methoxylových skupin ve struktuře agarózy. Díky tomu existují různé modifikované formy agarózy. Jak již bylo zmíněno, jedná se o termoreverzibilní polysacharid, tudíž opětovným zahřátím vzniklého gelu vzniká sol. Proces gelace souvisí se změnou chemické struktury, přičemž dochází k nárůstu dvojitých helikálních struktur a následnému vzniku třídimenzionálních sítí [45][46].

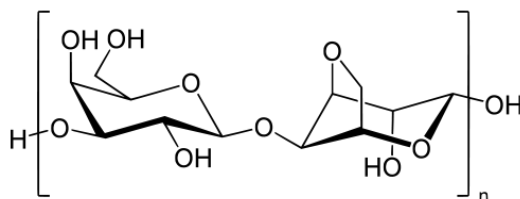


Obrázek 12: Záznam ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) trojrozměrné sítě agarózového gelu [47]

Struktura a využití agarózy

Agaróza je lineární termoreverzibilní polysacharid, který je tvořen opakujícími se jednotkami agarobiózy. Ta je složena z galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy (Obrázek 13). Zaujímá

jednoduchou a v některých případech dvojitou helikální konformaci. Trojrozměrná síť jejímž základem jsou asociované dvojité helikální struktury, je následně stabilizována vodíkovými můstky [48].



Obrázek 13: Strukturní vzorec agarózy [49]

V různých odvětvích průmyslu se využívá různých koncentrací agarózových hydrogelů. Například v *potravinářství* jsou využívány spíše méně koncentrované gely. V *potravinářství* se agaróza nejčastěji uplatňuje jako želírovací a zahušťovací prostředek do mléčných a mastných výrobků [50]. Naopak ve *farmacii* a *mikrobiologii* se využívají spíše koncentrovanější gely, které jsou odolnější, např. využití jako scaffold ve tkáňovém inženýrství, kdy hydrogel poskytuje mechanickou oporu pro růst buněk. Díky svým mechanickým vlastnostem, zejména křehkosti, má agaróza v některých odvětvích omezené využití [51][49].

Biotechnologické aplikace agarózy a jejích derivátů se dělí na pět hlavních kategorií:

1. *elektroforetické aplikace* – agarózové gely vykazují nízkou afinitu k interakcím s ostatními látkami, a proto se využívají jako nosná média pro gelovou elektroforézu při separaci proteinů, nukleových kyselin a jejich derivátů. Separace podle náboje jsou založeny na odlišné migraci nabitých částic v elektrickém poli. Pro separaci různě velkých molekul je důležité zvolit vhodnou koncentraci gelu. Čím vyšší je koncentrace agarózového gelu, tím menší je velikost pórů uvnitř gelu a rychlost pohybu separovaných molekul se sníží. Elektroforéza se často využívá v klinických laboratořích pro identifikaci proteinů.
2. *imunologické aplikace* – agaróza se v imunologii využívá převážně pro detekci a studium antigenních materiálů (ukazatelé onemocnění) a jejich specifické protilátky.
3. *buněčné aplikace* – agaróza se již dlouho využívá jako standardní médium pro růst a výživu mikroorganismů a buněčných kultur, neboť obsahuje vysoký podíl vody (až 99 hm. %). Nevýhodou použití agarózy je poměrně vysoká teplota gelace, což může být nepříznivým faktorem pro živé organismy. Další možností, jak využít agarózových hydrogelů jako scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Hydrogel poskytuje mechanickou oporu pro buňky a vysoký obsah vody poskytuje vhodné prostředí pro růst buněk, příp. celých tkání.
4. *chromatografické aplikace* – využití agarózy ve speciálních kolonách se specifickou velikostí pórů pro separaci molekul větších než 250 000 Da. Další využití může být také v podobě stacionární fáze v gelové permeační chromatografii.
5. *technologie imobilizovaného enzymu* – použití agarózových filmů, částic nebo kuliček pro upevnění enzymů nebo „uzavření“ buňky a následně jejich použitím (jako biokonvertorů) přeměnit jednu chemickou látku na jinou. Praktickým příkladem je použití agarózy k zapouzdření aktivního uhlí a iontoměničové pryskyřice

v agarosových kuličkách pro hemoperfúzi k detoxikaci osob v případě předávkování drogami.

Další velmi důležitou oblastí využití agarózy je *fyzikální chemie*. Pro své vhodné mechanické i optické vlastnosti mohou být agarózové hydrogely hojně využity ke studiu biopolymerů a řady dalších látek. Obrovskou výhodou při používání agarózy je její velmi nízká afinita k interakcím se studovanými látkami. Při měřeních pak tedy nedochází k ovlivnění jednotlivých procesů (např. difúze). Právě pomocí difúzních experimentů lze studovat reaktivitu řady látek v hydrogelové fázi. Pro tyto experimenty je možné připravit hydrogelová média o konkrétních požadovaných rozměrech a vlastnostech. Výsledky měření pak lze snadno aplikovat na matematické či fyzikální teoretické modely [52].

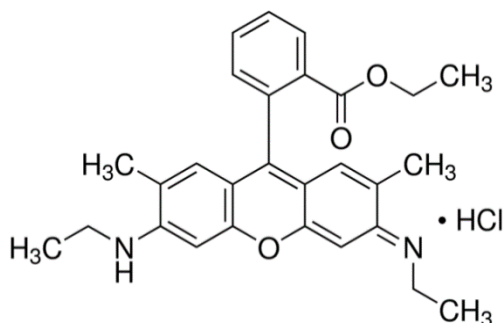
2.6 Difúzní sondy

2.6.1 Rhodamin

V rámci studia bariérových a transportních vlastností vybraných polyelektrolytů v hydrogelových maticích v této diplomové práci byla studována interakce s kationaktivním barvivem rhodaminem 6G (R6G). R6G se používá jako indikační barvivo ve vodě k určení rychlosti a směru proudění a to proto, že jeho difúze v hydrogelech je opravdu široce rozšířena. Toto barvivo bylo vybráno z důvodu, že v roztoku tvoří kladně nabitě částice a dá se tedy předpokládat jeho interakce se záporně nabitými molekulami.

Struktura a vlastnosti využití R6G

Rhodaminová barviva mají rigidní a planární centrální molekulární strukturu. Vyznačují se dlouhými vlnovými délkami excitace a emise, v oblastech 480–600 nm a 500–700 nm. R6G je zcela rozpustný v methanolu, ethanolu a jiných organických rozpouštědlech. Ve vodných roztocích agreguje v koncentracích vyšších než 10^{-6} M. Tento jev je způsoben hydrofobními interakcemi mezi alkylovými substituenty na molekule. Dochází k formování dimerů a oligomerů. Při dostatečném zředění, kdy je potlačena agregace, je absorpční maximum při vlnové délce 525 nm a maximum emise 554 nm [53][54].



Obrázek 14: Struktura rhodaminu 6G [55]

Využití R6G

R6G je jedním z hojně využívaných fluoroforů. Kromě použití jako fluorescenčního barviva se využívá jako barvivo v kapalných laserech. Barvivo je levné, má pozoruhodně vysokou fotochemickou stabilitu, vysoký kvantový výtěžek fluorescence a jeho rozsah vyzařování

laserového paprsku (555 až 585 nm) je blízký jeho absorpčnímu maximu (přibližně 530 nm). Rhodamin 6G je jedním z nejpoužívanějších a nejstudovanějších laserových barviv. Dále se používá ve velké míře v *biotechnologických aplikacích*, jako je fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie, fluorescenční korelační spektroskopie a ELISA [56].

2.7 Gelové soustavy

Gely jsou disperzní systémy, které ve své struktuře tvoří trojrozměrnou makromolekulární síť makroskopické velikosti a elastických vlastností. Síť může vzniknout z lineárního polymeru, nebo jeho roztoku, vytvoří-li se mezi makromolekulami dostatečný počet spojů. Tyto spoje (uzly sítě) mohou vznikat chemickou reakcí nebo mezimolekulárním působením fyzikálních sil. Proces vzniku gelu nazýváme *gelace* [57].

2.7.1 Klasifikace gelových soustav

Podle toho, zda gelové soustavy obsahují nebo neobsahují ve své struktuře rozpouštědlo, je dělíme na dvě skupiny [57]:

- *xerogely* – neobsahují ve své struktuře rozpouštědlo
- *lyogely* – obsahují rozpouštědlo (hydrogel, organogel)

Vysušením lyogelu vzniká kompaktní xerogel, jehož objem je menší přibližně o objem odstraněného rozpouštědla. Xerogel lze uvést do původního stavu lyogelu nabotnáním. Převod na xerogel je tedy vratný. Tím se makromolekulární gely liší od gelů připravovaných z lyofobních solí [57].

Podle charakteru chování příslušného xerogelu ve styku s kapalinami lze tedy gely rozdělit do dvou skupin [58]:

- *reverzibilní (elastické)* – tento typ gelů při vysoušení zmenšuje svůj objem, až dojde k úplnému odstranění volného disperzního prostředí a vzniku kompaktního xerogelu. Tyto kompaktní xerogely jsou poté schopny přecházet do původního stavu lyogelu přijímáním původního disperzního prostředí.
- *ireverzibilní (neelastické)* – tento typ gelů je charakteristický tím, že si při vysoušení udržuje prakticky stejný objem jako původní lyogel. Při styku s disperzním prostředím je sice schopen xerogel z ireverzibilního gelu částečně nabotnat a nasorbovat určité množství disperzního prostředí, ovšem do původního stavu lyogelu se již nevrací.

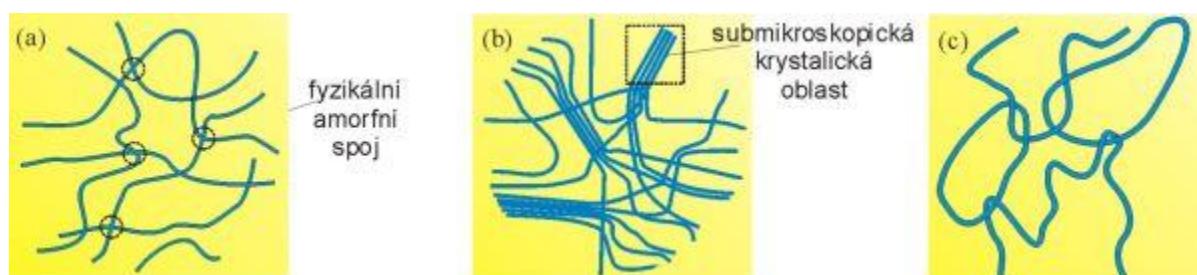
2.7.2 Vznik gelové struktury

Gelová struktura vzniká procesem zvaným *gelace*, což je proces, při němž se spojováním koloidních částic disperzního podílu v souvislou strukturu vytváří a postupně zpevňuje prostorová síť [59].

Proces gelace je charakterizován tzv. *bodem gelace*. Bodem gelace je nazýván krátký okamžik, při němž je vytvořena nekonečná trojrozměrná síť. Slovo „nekonečná“ chápeme tak, že rozměry vzniklé sítě jsou totožné s rozměry systému. V gelační křivce znázorňuje bod gelace okamžik, který odpovídá vzniku prvního vážitelného podílu trojrozměrné sítě. První

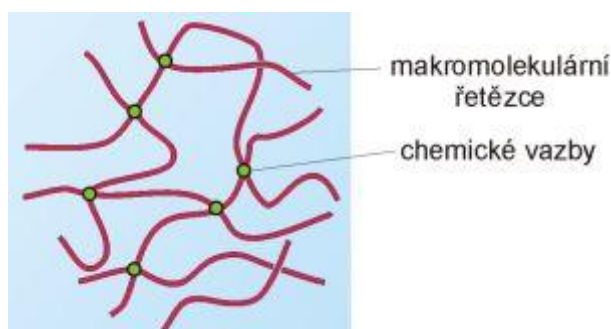
stopy gelu v systému se objeví tehdy, pokud vznikne alespoň jeden útvar v systému, který dosahuje makroskopických rozměrů [60][61][10].

Fyzikálně síťovaný gel vzniká vlivem fyzikálních sil, kdy jsou spojovány úseky polymerních řetězců do uzlů nebo uzlových oblastí. K asociaci mezi jednotlivými řetězci dochází tehdy, když je snížena afinita skupin/sekvencí k rozpouštědлу např. snížením teploty, zvýšením koncentrace nebo zhoršením kvality rozpouštědla. Pokud je asociace nepravidelná až náhodná vznikají *amorfní gely*. Pokud se části lineárních makromolekul ukládají rovnoběžně, vzniká v těchto oblastech krystalická mřížka a vznikají gely, kde se střídají oblasti s krystalickou strukturou a oblasti amorfní, nazýváme je tzv. *krystalicity*. Přechod od amorfního gelu ke krystalitu je spojitý. Dále může působením fyzikálních sil docházet ke *geometrickému síťování*, kdy se gel tvoří mechanickým propletením řetězců vlivem tepelného pohybu [58].



Obrázek 15: Sítovitá struktura vysokomolekulárních gelů
(a) amorfní gel, (b) gel se submikroskopickými krystalickými oblastmi, (c) geometricky síťovaný gel [58]

Chemicky síťovaný gel, nebo také kovalentně síťovaný gel, představuje nekonečnou trojrozměrnou strukturu, která vzniká vhodně uspořádanou polymerací monomeru nebo z již hotových lineárních polymerů zesíťováním. Jejich vysušením vznikají xerogely a naopak v rozpouštědlech bobtnají [58].



Obrázek 16: Kovalentně síťovaný gel [58]

2.7.3 Vlastnosti gelových soustav

Mechanické vlastnosti

I když je disperzní prostředí gelů kapalné, mají mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav. Gel je schopen odolávat tečnému napětí až do určité hodnoty, pod kterou se chová jako elastické tuhé těleso. Pokud není tohle tečné napětí příliš velké, gely se deformují vratně (elasticky) [58].

Některé reverzibilní i ireverzibilní gely s fyzikálními spoji mohou mít tixotropní vlastnosti. Jsou-li síly poutající původní disperzní částice do síťové struktury velmi slabé, je možné gel více nebo méně prudkým protřepáním převést opět na sol. Pokud tento tekutý sol necháme stát v klidu, přerušené vazby se obnoví a dochází k nové gelaci [58].

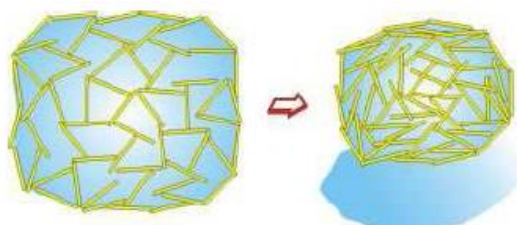
Elektrická vodivost a difuzivita

Elektrická vodivost gelů, jejichž disperzní prostředí obsahuje disociované nízkomolekulární elektrolyty, zůstává téměř stejně vysoká jako v odpovídajícím solu.

Difuzivita nízkomolekulárních látek v gelu je jen o něco menší než v původním solu, ačkoliv při gelaci prudce vzrůstá viskozita soustavy. Malé molekuly a ionty rozpuštěných látek se pohybují v disperzním prostředí mezi sítí tvořenou disperzním podílem téměř stejně rychle jako v solu. Díky síťové struktuře gelu není difúze nízkomolekulárních látek téměř ovlivňována prouděním ani tepelnými konvekcemi [58].

Synereze

U čerstvě připravených gelů (reverzibilních i ireverzibilních) dochází k řadě samovolných procesů, neboť tyto systémy ještě nejsou v termodynamické rovnováze. Jedním z těchto dějů je *synereze* (stárnutí). Při tomto ději roste počet styčných bodů, síťovitá struktura se smršťuje a s ní celý gel. Část původně přítomné kapaliny, pro kterou již není v gelu místo, je vytlačována a odměsí se od gelu. Děj synereze je podporován zvýšením teploty a také přidávkem elektrolytů [58].



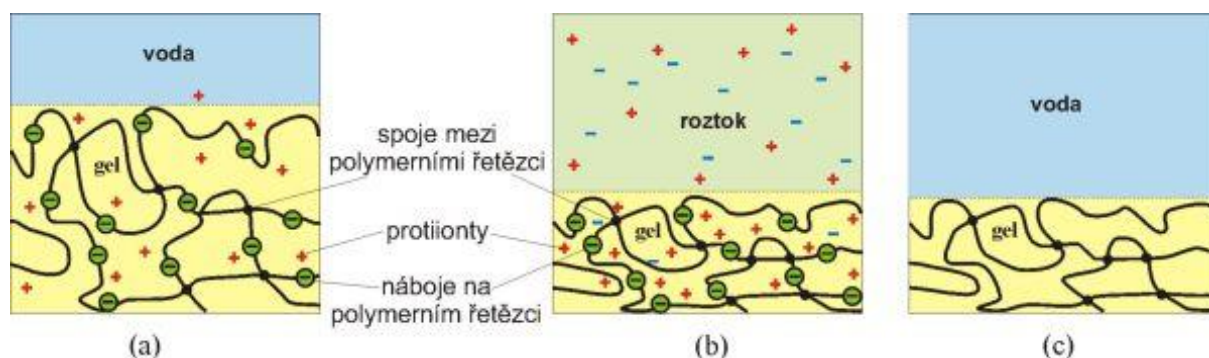
Obrázek 17: Proces stárnutí gelu – synereze [59]

Botnání

Procesem botnání rozumíme pohlcování nízkomolekulárního rozpouštědla reverzibilním xerogelem, který při tom zvětšuje svou hmotnost i objem za vzniku lyogelu [59].

Botnání se může zastavit ve stadiu elastického lyogelu (omezené botnání), nebo vede k úplnému rozpuštění gelu (neomezené botnání). O tom, zda bude docházet k omezenému nebo neomezenému botnání, rozhoduje předně pevnost spojů mezi makromolekulami v xerogelu, afinita polymeru k rozpouštědлу, struktura gelu, i fyzikální podmínky – teplota, tlak, přítomnost jiných rozpuštěných látek. Při změně fyzikálních podmínek mohou tytéž látky, tvořící gelovou strukturu, přecházet z kategorie omezeného botnání do neomezeného a naopak. Rychlost botnání s rostoucí teplotou vždy vzrůstá. Děj může být exotermní nebo endotermní podle polaritý rozpouštědla i botnajícího polymeru. Při exotermním botnání se rovnovážný stupeň nabotnání s rostoucí teplotou snižuje, při endotermním pochodu

se naopak zvyšuje. Botnění gelů polyelektrolytů je do značné míry ovlivněno hodnotou pH a přítomností elektrolytů v roztoku [59].



Obrázek 18: Botnění gelu vysokomolekulárního elektrolytu [59]:

(a) v čisté vodě, (b) v roztoku nízkomolekulárního elektrolytu, (c) nedisociovaný gel stejné struktury v čisté vodě

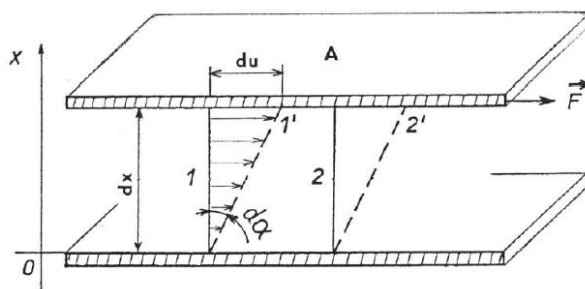
2.8 Metody charakterizace gelových soustav

2.8.1 Reologie

Reologie jako vědní obor se zabývá studiem vnitřní reakce látek (pevných i tekutých) na působení vnějších sil, resp. jejich deformovatelností a tokovými vlastnostmi. Zjednodušeně řečeno, reologie je nauka o toku. Tok označujeme také pojmem viskózní deformace. Působením vnější síly se deformace stále zvětšuje, přičemž rychlost zvětšování této deformace je úměrná působící síle [62].

Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou reologické stavové rovnice, které zpravidla vyjadřují vztah mezi deformačním smykovým (tečným) napětím τ a deformací kapaliny. Jejich grafickou podobou jsou tokové křivky [63].

Pro určení základních reologických parametrů se používá model s posuvnými deskami. Model se skládá z dolní nepohyblivé a horní pohyblivé desky. Vzdálenost obou desek dx je konstantní. Vrchní deska o ploše A [m²] se pohybuje vůči dolní desce rychlostí du [m·s⁻¹] pomocí síly F [N].



Obrázek 19: Rychlostní profil toku v kapalině mezi nepohyblivou a pohybující se deskou [64]

Viskozita kapalin je definována za předpokladu laminárního proudění kapalin. Projevuje se jako odpor proti pohybu částic kapaliny. Viskozita je závislá na druhu kapaliny.

Newtonské kapaliny jsou látky, jejichž viskozita se při zvyšujícím se smykovém napětí nemění a tečné napětí je pak lineárně závislé na smykové rychlosti [64]. V případě ideálně viskózního materiálu platí pro tečné napětí klasický Newtonův zákon:

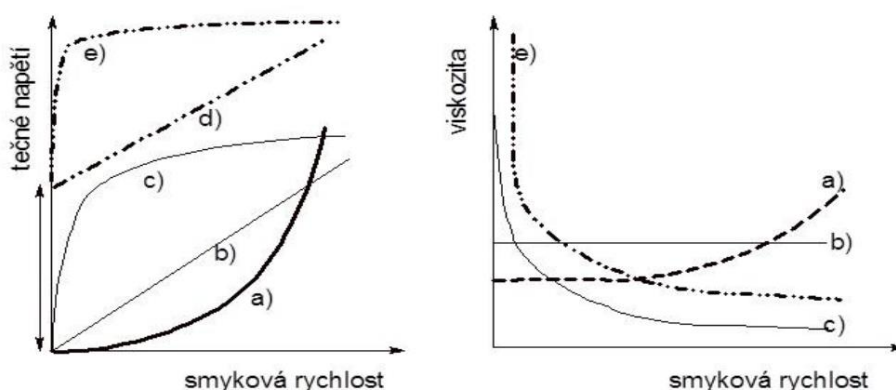
$$\eta = \frac{\tau}{\left(\frac{d\gamma}{dt}\right)} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}, \quad (1)$$

kde τ je tečné napětí a $\dot{\gamma}$ je smyková rychlost kapaliny.

Vedle newtonských kapalin existují i kapaliny reologicky složitější, které se Newtonovým zákonem viskozity neřídí. Označují se jako *nenevtonské kapaliny* a jsou to například roztoky a taveniny polymerů, suspenze, různé pasty apod. platí pro ně analogicky s Newtonovým zákonem rovnice:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n, \quad (2)$$

kde K , n jsou empirické látkové parametry charakterizující vlastnosti toku nenevtonské kapaliny a závisejí na teplotě. Parametr K je součinitel (koeficientem) konzistence a n je index toku ($n > 1$ pro pseudoplasticitu, $n = 1$ pro newtonské kapaliny, $n < 1$ pro dilataci) [64].



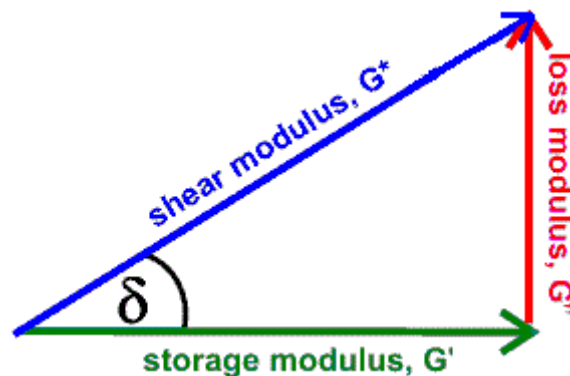
Obrazek 20: Tokové a viskozitní charakteristiky některých kapalin
a) dilatantní, b) newtonská, c) pseudoplastická, d) Binghamská, e) plastická [64]

Anomálie viskozity mohou být velmi různorodé a v praxi se můžeme setkat i s různými kombinacemi chování viskózního s elastickým (kapaliny viskoelastické nebo elastoviskózní). Do této skupiny kapalin se řadí např. velmi koncentrované suspenze a velmi koncentrované roztoky makromolekul [64].

Z reologického hlediska jsou *gely* typickým příkladem tzv. viskoelastických materiálů. Reologické měření charakterizuje, nakolik je gel „tekutý“ nebo naopak „tuhý“. Projevem elasticity je pak zvýšení tzv. elastického (paměťového) modulu G' nad tzv. viskózní (ztrátový) modul G'' .

$$G^* = G' + iG'', \quad (3)$$

kde G^* je komplexní (smykový) modul (podává informaci o celkové odolnosti materiálu vůči deformaci).



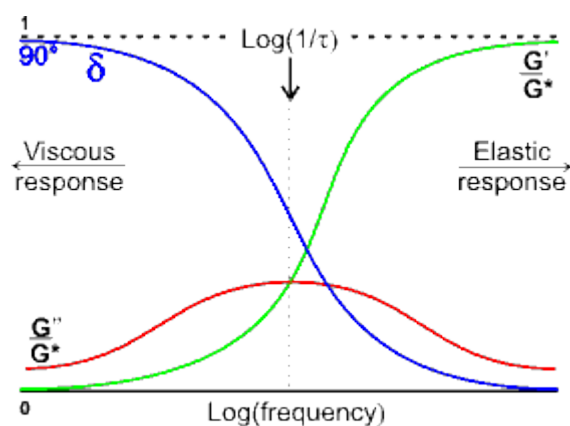
Obrázek 21: Složky komplexního modulu [65]

Elastický modul G' tvoří reálnou složku komplexního modulu G^* a podává informaci o schopnosti tělesa uchovávat elastickou energii. Ztrátový modul G'' tvoří imaginární složku komplexního modulu G^* a souvisí pak s nevratnou změnou deformační energie, tzn. vypovídá o míře projevu viskózního charakteru chování látky [66]. Poměr těchto dvou modulů pak určuje míru převahy elastického, resp. viskózního charakteru a jeho deformačního chování [67]. Získáváme pak hodnotu ztrátového úhlu δ :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (4)$$

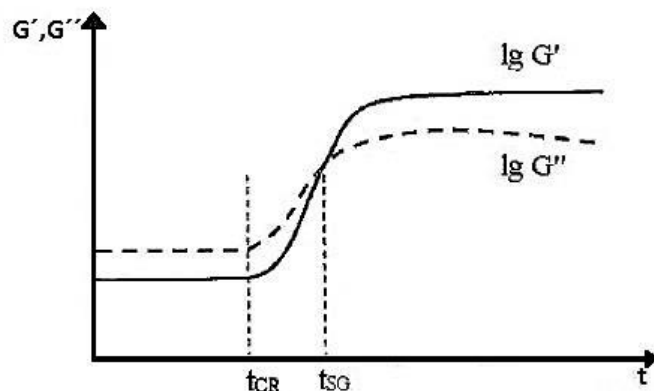
Z velikosti hodnoty ztrátového úhlu pak můžeme usuzovat, jaký bude mít daná látka charakter, tzn., zda bude převažovat viskoelastický charakter s převahou viskozity, nebo elasticity.

- pokud je $\tan \delta = 1$ ($\delta = 45^\circ$) a tím pádem nepřevažuje žádná ze složek a látka vykazuje viskoelastické chování
- pokud je $\tan \delta > 1$ ($\delta > 45^\circ$), pak převažuje viskózní složka a látka vykazuje viskoelastický charakter s převahou viskozity
- pokud je $\tan \delta < 1$ ($\delta < 45^\circ$), pak převažuje elastická složka a látka vykazuje viskoelastický charakter s převahou elasticity



Obrázek 22: Závislosti viskoelastických parametrů na frekvenci oscilaci [65]

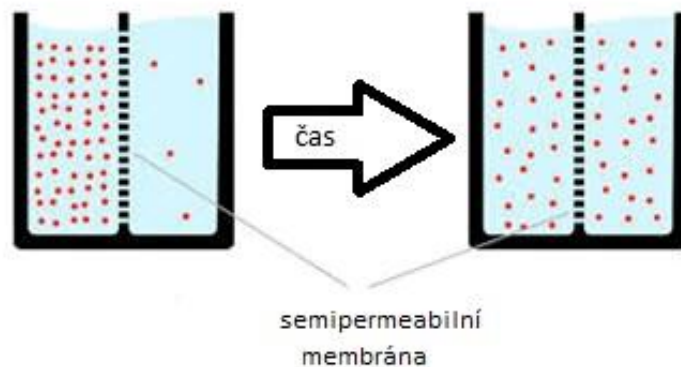
Prakticky každý reálný materiál je totiž alespoň do určité míry viskoelastický a poměr těchto dvou modulů pak určuje míru viskoelastického charakteru s převahou viskozity, nebo elasticity a jeho deformačního chování. Časový bod t_{CR} na následujícím grafu (Obrázek 23) značí počátek gelace a časový bod t_{SG} indukuje přechod mezi solem a gelem (tzv. bod gelace) [64][68].



Obrázek 23: Časová závislost elastického G' a viskózního G'' modulu v průběhu síťování vzorku [68]

2.9 Difúzní procesy

Pojmem difúze můžeme charakterizovat samovolné rozptylování částic v prostoru z důvodu neuspořádaného tepelného Brownova pohybu. Tento pohyb probíhá z prostředí více koncentrovaného do prostředí méně koncentrovaného. Avšak difúze se netýká pouze jedné látky, týká se všech látek, které se pohybují v daném systému. Výsledkem difúze, pokud do hry nevstupují žádné další faktory, je rovnoměrné rozptýlení rozpuštěné látky v rozpouštědle [69].



Obrázek 24: Přechod látky přes semipermeabilní membránu [70]

Rychlost šíření částic je ovlivněna velikostí částic, teplotou i vlastnostmi prostředí. Klesá s rostoucím poloměrem částic; v koloidně disperzních systémech je značně menší než u analytických disperzí a v hrubých disperzích je neměřitelná, neboť u nich difúze prakticky neprobíhá a převládá rychlý proces sedimentace. Rychlost difúze je ve stacionárním prostředí vyjadřována *difúzním tokem* J_i [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$], definovaným jako látkové množství difundující složky n_i , které za jednotku času projde zvoleným průřezem A kolmým ke směru difúze [59]:

$$J_i = \frac{d n_i}{A \cdot d\tau} \quad (5)$$

2.9.1 Fickovy zákony

I. Fickův zákon

Difúzní procesy jsou charakterizovány Fickovými difúzními zákony (FZ).

Podle I. FZ je difúzní tok při stacionární difúzi (difúze probíhá ve směru jedné osy) definovaný jako koncentrace difundující složky i , které za jednotku času projde jednotkovou plochou kolmou ke směru difúze, tj. úměrný koncentračnímu gradientu. Difúze probíhá proti směru koncentračního gradientu, z tohoto důvodu se na pravé straně rovnice (6) vyskytuje znaménko minus. Hnací silou je pak v případě stacionární difúze koncentrační gradient [69]:

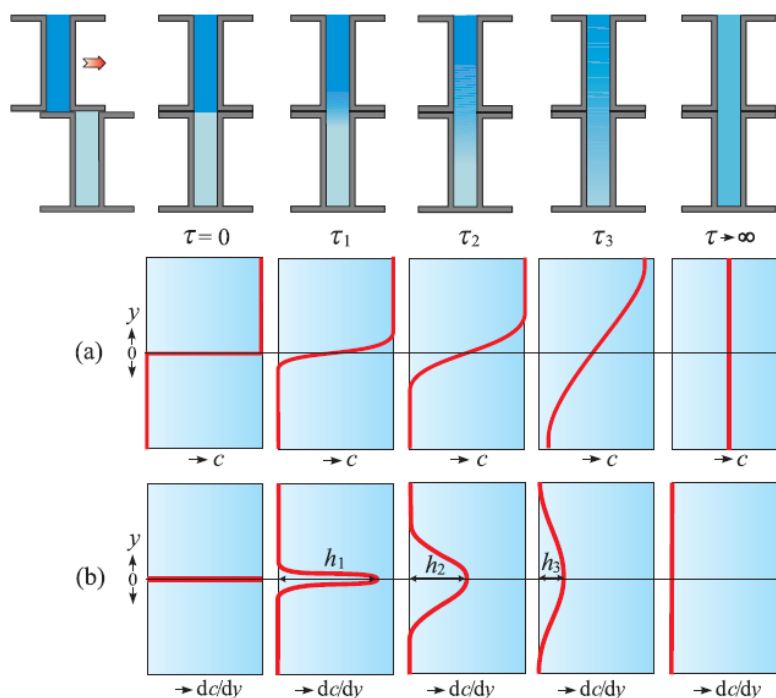
$$J_i = -D_i \cdot \frac{dc_i}{dx} \quad (6)$$

Symbol parciální derivace znamená, že veličiny jsou také funkcí teploty, tlaku a také času. Příkladem uspořádání při měření stacionární difúze je např. vertikální difúzní cela, na jejímž dolním konci je udržována konstantní koncentrace sycením roztoku rozpouštěním tuhé fáze a na horním konci je udržována nulová koncentrace omýváním pomalým proudem čistého rozpouštědla [58].

Koeficient úměrnosti neboli *difúzní koeficient* D_i [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] je číselně roven látkovému množství difundující složky i , které projde jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu. Závisí jak na vlastnostech prostředí, tak na vlastnostech difundujících částic. Při stacionární difúzi se koncentrační gradient dc/dx nemění s časem.

II. Fickův zákon

II. FZ vyjadřuje změnu koncentrace difundující látky s časem při nestacionární difúzi (*koncentrační gradient se mění s časem a difúzní tok se mění s polohou*). Průběh nestacionární difúze je znázorněn na obrázku (Obrázek 25), který znázorňuje měření difúzního koeficientu metodou volné difúze. Roztok v horní části kyvety se posunutím ve směru zelené šipky uvede do styku s rozpouštědlem a méně koncentrovaným roztokem ve spodní části kyvety. Začíná se tvořit koncentrační rozhraní, které se ale s časem rozplývá. Poté se analyticky měří koncentrace v různém čase od počátku difúze a v různých místech systému. Z průběhu koncentrace (Obrázek 25a) nebo koncentračního gradientu (Obrázek 25b) pak můžeme stanovit hodnotu difúzního koeficientu.



Obrázek 25: Průběh nestacionární difúze
(a) průběh v různých časech, (b) průběh koncentračního gradientu [58]

Jestliže není difúzní koeficient závislý na koncentraci, má II.FZ pro nestacionární difúzi tvar:

$$\frac{dc_i}{d\tau} = \text{div}(D_i \cdot \text{grad } c_i) = D_i \cdot \text{div grad } c_i \quad (7)$$

Tato rovnice lze však zjednodušit a to tak, že difúze probíhá pouze ve směru osy x:

$$\frac{dc_i}{d\tau} = D_i \cdot \frac{d^2 c_i}{dx^2} \quad (8)$$

Tato rovnice pak po integraci poskytne závislost:

$$c_i = c_i(x, \tau) \quad (9)$$

Z rozměrové analýzy II. FZ vyplývá, že u difúzních procesů, existuje základní vztah mezi uplynulým časem a druhou mocninou délky, po kterou difúze probíhá. Pochopení tohoto vztahu je pro přesné numerické simulace difúze velmi důležité. Za účelem řešení Fickových rovnic pro jednotlivé typy difúze vznikla databáze difúzních modelů. Řešení difúzních rovnic pro celou řadu modelů a okrajových podmínek publikoval *John Crank* [71]. Mezi nejjednodušší difúzní modely patří například *difúze skrz tenký film* a *volná difúze*, mezi složitější difúzní modely pak *volná difúze s chemickou reakcí* a *difúzní procesy v porézním médiu*.

2.9.2 Stanovení difúzního koeficientu metodou Stokesovy diafragmové cely

Tato metoda se vyznačuje poměrně nízkými náklady a vysokou přesností (*dá se dosáhnout snížení relativní chyby až na 0,2 %*), proto se tato metoda často volí jako tzv. startovací

metoda pro difúzní experimenty. Nevýhodou této metody je však použití poměrně vysokých objemů studovaných roztoků (v našem případě 60 ml).



Obrázek 26: Diafragmová difúzní cela (PermeGear, Inc.) [72]

Jak je viditelné na obrázku (Obrázek 26), diafragmová difúzní cela obsahuje dvě oddělené horizontálně uspořádané komory, mezi které byla v našem případě vložena agarózová hydrogelová přepážka o přesně definované tloušťce a tvaru, skrz kterou pak probíhala difúze. Každá komora se skládá z vnějšího pláště (*průtočný – slouží k zajištění konstantní teploty experimentu*) a vnitřního pláště (*slouží k realizaci celého experimentu*). Obě komory byly naplněny roztoky o rozdílné koncentraci tak, aby byl koncentrační gradient co nejvyšší – jedna z komor byla naplněna destilovanou vodou a druhá koncentrovaným roztokem (v našem případě organické barvivo R6G). Změna koncentrace roztoku v přijímací cele se měřila určenou analytickou metodou (*spektrofotometricky*) v určitém časovém rozmezí a difúzní koeficient se vypočítal ze vztahu [73]:

$$D = \frac{1}{\beta \cdot t} \ln \left[\frac{(c_Z - c_P)_0}{(c_Z - c_P)_1} \right], \quad (10)$$

kde t představuje čas experimentu, c_P a c_Z pak koncentraci roztoku v přijímací a zdrojové difúzní cele a β představuje konstantu aparatury a lze vypočítat pomocí vztahu [73]:

$$\beta = \frac{A \cdot \varepsilon}{l} \ln \left(\frac{1}{V_Z} + \frac{1}{V_P} \right), \quad (11)$$

kde A představuje plochu, přes kterou látka difunduje, ε značí rozdělovací koeficient na rozhraní, l je efektivní tloušťka membrány a V_P a V_Z celkový objem kapaliny v přijímací a zdrojové difúzní cele. Konstanta aparatury β je výrazně ovlivněna vlastnostmi porézní membrány (*např. velikostí pórů*) a proto musí být stanovena experimentálně.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Na problematiku probíranou v této diplomové práci se dá nahlížet dvěma možnými způsoby, které budou dále přiblíženy v následujících kapitolách:

1. interakce polutantů a dalších životní prostředí znečišťujících látek s aktivními látkami
2. využití difúzních technik jako vhodných metod pro stanovování difúzního koeficientu

3.1 Difúzní procesy v gelových fázích

Gelová fáze je velmi vhodná pro studium transportních a bariérových vlastností různých látek. Značnou výhodou gelových disperzních soustav je to, že můžeme jejich přípravou dosáhnout materiálů o přesně definovaných vlastnostech.

L. Masaro a X. X. Zhu [74] ve svém přehledovém článku podrobně shrnují různé fyzikální modely a teorie difúze a jejich použití při popisu difúze v polymerních roztocích, gelech, a dokonce i pevné fázi. V článku byly navrženy různé teoretické popisy difúzních procesů. Difúze byla studována pomocí různých technik, jako jsou gravimetrie, membránová propustnost, fluorescence a radioaktivní značení. Tato studie vedla k rozšíření znalostí o morfologii polymerů, transportních jevech a řízeném uvolňování léčiv z polymerních nosičů.

P. Sedláček a spol. [52] se zaměřují na zkoumání transportu iontů methylenové modři ve vodném roztoku, v agarózovém hydrogelu nebo v hydrogelu s přídavkem huminové kyseliny. Experimenty byly realizovány metodou difúzní cely jako alternativní technikou studia reaktivity. Experimentální výsledky jasně ilustrují imobilizaci účinky huminových kyselin na přepravu methylenové modři v gelech. Z výzkumu je zřejmé, že již malý obsah HK má značný vliv na zvýšení adsorbovaného množství methylenové modři, k navýšení času potřebného k proniknutí gelem a přejití do rovnovážného stavu.

Prezentované difúzní experimenty se zaměřují především na ustálenou difúzi a byly navrženy s cílem popsat odděleně tři hlavní vlivy, které společně působí na dopravu rozpuštěných iontových látek v reaktivních hydrogelech. Tyto účinky pak jsou rozdělovány rozpuštěné látky na rozhraní roztok/gel, nižší propustnost způsobená porézním charakterem hydrogelu, a nakonec specifické fyzikálně-chemické interakce mezi rozpuštěnou látkou a reakčním obsahem pevné hydrogelové sítě. Pro tento účel bylo šíření barviva studováno odděleně ve vodě, v agarózovém hydrogelu, který můžeme považovat za nereaktivní a v hydrogelu s malým přídavkem vysoce reaktivní huminové látky. Rozdíly ve stanovených difúzních vlastnostech v těchto prostředích mohou být použity k vyhodnocení relativního významu jednotlivých výše uvedených hlavních vlivů [52].

P. Sedláček a spol. [75] se dále zaměřují i na nestacionární difúzi u dvou kationtových barviv (methylenová modř a rhodaminu 6G). Nestacionární difúze byla studována u hydrogelů s různým obsahem agarózy a huminových kyselin. Koncentrace použitých barviv byla sledována spektrofotometricky v různých vzdálenostech. Byl také zkoumán vliv teploty, pH a iontové síly na difúzi. Výsledky potvrzují, že hodnota rovnovážných konstant se zvyšují s obsahem HK v gelu a překvapivě také s klesající hodnotou pH uvnitř gelu.

Nestacionární difúzní experimenty doplňují dříve používanou metodu difúzní cely. Zatímco experimenty v difúzní cele se zaměřují na ustálenou fázi procesu difúze a ilustrují především bariérové vlastnosti materiálu po jeho pronikání rozpuštěné látky, v nestacionárních

experimentech je to více komplikované. Umožňují další pohled do zvláštních efektů, které definují transport rozpuštěných látek [75].

Mezi další organická barviva, která se dají při studiu difúzních procesů používat patří např. malachitová zeleň, ethylenová modř a krystalová violet. Všechna tato barviva byla využita ve studii *T. S. Anirudhana a P. S. Suchithra* [76], kdy se autoři zabývali adsorpcí těchto kationtových barviv z vodných roztoků na adsorbent tvořený HK, imobilizovaný amin, polyakrylamidem a bentonitovým kompozitem. Studie ukázala, že sorpce je závislá na pH, že sorpce snižuje konečné pH reakční směsi a že kompozit Ha-Am-PAA-B je vhodný pro odstranění těchto barviv z vodných roztoků.

3.2 Další metody pro studium transportních a bariérových vlastností

Hydrogely na bázi přírodních látek, jako jsou hlen či bazální lamina, hrají klíčovou roli v biologii, kde ovládají výměnu látek, ale také představují významnou difúzní bariéru, která musí být překonána při úspěšné distribuci léků. Charakterizace permeabilních vlastností takových hydrogelů je důležitá pro vývoj vhodných vektorů pro podávání léků a farmaceutických prostředků. *I. Vladescu a spol.* [77] ve své publikaci uvádějí nový experiment (*adsorpční chromatografická zkouška*) pro kvantifikaci hromadné propustnosti hydrogelů. Charakterizují mucinové hydrogely a kvantifikují vliv environmentálních parametrů (hustoty polymeru, pH a mukolytických chemikálií) na gelovou permeabilitu. Zde popsaná technika představuje potenciálně vhodnou platformu pro navrhování a screening nových nosičů léků, testování a vývoj nových gelů pro širokou škálu biomedicínských aplikací.

Hromadné přenosy různých molekul (voda, barviva, aromáty) v potravinářských výrobcích vedou ke zkvalitňování úpravy potravin, a vyžadují použití ochranných jedlých filmů nebo povlaků mezi potravinami. V důsledku toho je důležité posoudit bariérové vlastnosti a efektivitu jedlých filmů a také stanovení difuzivity migrujících látek. Mezi různými metodami dostupnými pro odhad difuzivity umožňuje technika fluorescence po fotovybělení (FRAP) vyšetření difúze referenční molekuly (fluoresceinu) zavedené do *i*-karagenanových filmů, a to přímými a nedestruktivními měřeními. *T. Karbowiak a spol.* [78] dále v této publikaci sledovali difuzivitu pomocí vysokorozlišovací nukleární magnetické rezonance v pevné fázi (NMR). Musel být však dodržen předpoklad, že nedocházelo k reakci mezi rozpuštěnou látkou a potravinovým produktem.

Obdobnou problematikou se ve své publikaci zabývají *N. Benbettaieb a spol.* [79]. Zkoumali vliv účinku tloušťky filmu vyrobeného z polysacharidových polymerů, zejména z chitosanu a želatiny na vodní propustnost. Filmy mají dobré bariérové vlastnosti vůči plynům a jsou stále více používány v biomedicínském a potravinářském průmyslu. V publikaci byly studovány fyzikálně-chemické vlastnosti připravených filmů pomocí FT-IR analýzy. Přidání želatiny do chitosanových filmů indukovalo větší funkční vlastnosti (mechanické i bariérové) kvůli silným intermolekulárním interakcím, což mělo za následek kompaktní strukturu, která zlepšuje mechanické a bariérové vlastnosti.

Vodní transport ve filmech na bázi hydrofilních materiálů, jako je škrob, je složitým jevem kvůli silné interakci molekul sorbované vody s polymerní strukturou. Ve studii *A. M. Slavutského a spol.* [80] byly připravovány škrobové a škrob/celulóza-nanokrystalové (CNC) filmy a byly zkoumány jejich vodní bariérové vlastnosti. Naměřená rozpustnost, kontaktní úhel a izotermická sorpce vody ukázaly, že zesílené škrob/CNC filmy mají nižší afinitu k molekulám vody než škrobové filmy. Permeabilita, difuzivita a koeficienty

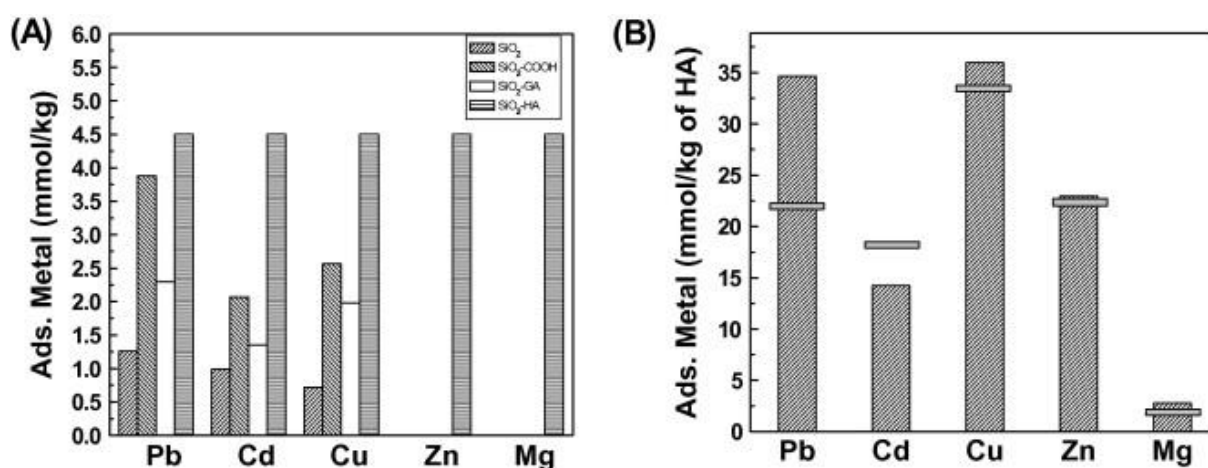
rozpuštěnosti ukázaly, že proces permeace závisí převážně na dráze vytvořené začleněním CNC, a tudíž byly hlavně řízeny difúzí vody. Interakce mezi CNC a škrobovým řetězcem je podporována chemickými podobnostmi obou molekul.

3.3 Interakce polyelektrolytů s opačně nabitými látkami

Polutanty patří mezi hlavní znečišťovatele odpadních vod a půdy, proto je nutné je určitým způsobem odstraňovat. Odstranění těžkých kovů je jednou z priorit v oblasti životního prostředí. Ve vodě rozpustné kovy mohou být odstraněny adsorpcí na chemicky funkcionalizovaných anorganických nosičích. Adsorpce je výsledkem dvou mechanismů – adsorpční a iontové výměny je ovlivněna mnoha faktory, jako jsou např. velikost částic, teplota, pH, doba kontaktu barviva a adsorbentu, povrch adsorbentu, či interakce barviva a adsorbentu [74][81].

S. Scally a spol. [82] se ve svém článku věnují studiu difúzních koeficientů kovových iontů a jejich komplexů ve třech různých typech hydrogelu na bázi polyakrylamidu. Experimenty byly založeny na metodě horizontální difúzní cely a sledovanými parametry byla tloušťka gelu, iontová síla roztoku a velikost ligandu. Bylo zjištěno, že difúzní koeficienty Pb, Ni, Cu a Cd iontů v jednoduchých anorganických roztocích byly nezávislé na iontové síle v oblasti 1 - 100 mmol·dm⁻³, s výjimkou velmi nízké iontové síly (0,1 mmol·dm⁻³), kde byly hodnoty difúzních koeficientů o 50 % nižší. Mezi zkoumanými komplexotvornými látkami byly také huminové a fulvinové kyseliny.

P. Stathi a Y. Deligiannakis ve své publikaci [83] testovali sorpční vlastnosti tří materiálů na bázi SiO₂, které byly připravené prostřednictvím imobilizace karboxylových skupin, fenolických skupin nebo huminových kyselin na povrch oxidu křemičitého. Jejich sorpční vlastnosti byly zkoumány na odstraňování těžkých kovů (Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ a Mg²⁺) z vodných roztoků. Výsledky poukazují na výrazné zlepšení sorpce kovů ve srovnání s nemodifikovaným oxidem křemičitým.



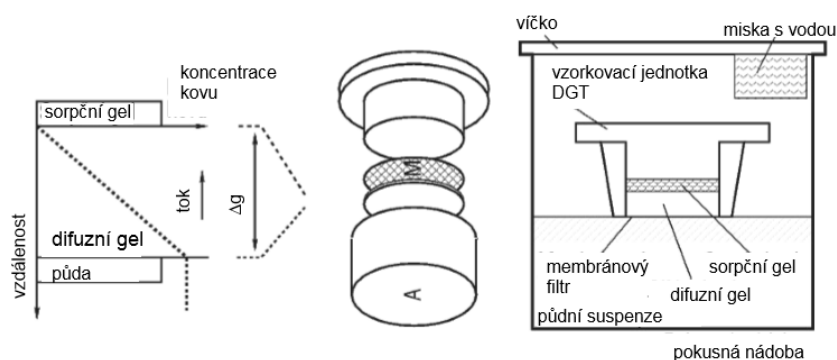
Obrázek 27: (A) množství (mmol/kg) nasorbovaných iontů těžkých kovů při pH=7, (B) maximální nasorbované množství (mmol/kg) iontů těžkých kovů na materiálu s obsahem HK při pH=7 [83]

N. Fatin-Rouge a spol. [84] zkoumali povahu a hustotu vazebných míst v agarózovém hydrogelu. Experiment byl prováděn rozdělováním různých látek mezi prostředími hydrogel/vnější roztok a přepravou těchto rozpuštěných látek v hydrogelu. Zároveň zohledňuje stericke, specifické a elektrostatické interakce mezi gelem a rozpuštěnou látkou

(kovovými ionty) a poskytuje obecně dobré výsledky pozorovaných účinků pH a iontové síly na dělení a šíření malých iontů. Současné výsledky jsou užitečné v různých aplikacích, kde mohou hrát změny pH a iontové síly důležitou roli, jako je podávání léků z gelu nebo použití agarózy pro *in situ* analýzy životního prostředí.

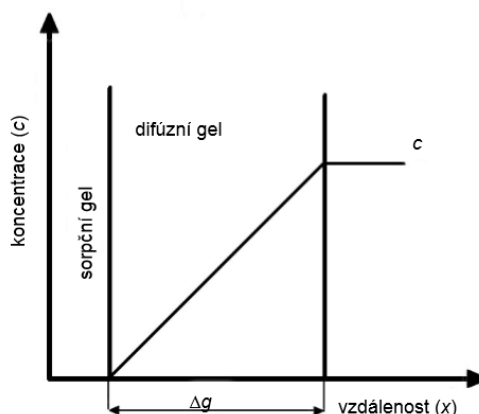
Y. Wang a S. Ding [85] zkoumali agarózové hydrogely jako stále více rozšířenou difúzní vrstvu technikou difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT – Diffusive Gradients in Thin films technique). V této studii byly testovány vlastnosti agarózového gelu v DGT měřeních u osmi kationtů (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) a osmi aniontů (P^{5-} , Co^{5-} , Cr^{6-} , Mo^{6-} , Sb^{5-} , Se^{6-} , V^{5-} , a W^{6-}). Bylo zjištěno, že tloušťka agarózy je klíčovým parametrem pro výpočet DGT stanovené koncentrace. Obohacení kationtů a odpuzování aniontů bylo v gelu pozorováno na základě iontové síly $<2\text{--}3\text{ mM}$ a $<1\text{ mM}$ (NaNO_3), v daném pořadí, které bylo přičítáno elektrostatickým interakcím těchto iontů s pevnými záporně nabitými skupinami. Pracovní rozsahy pH na agarózového gelu byly 4–10 pro anionty a 5–9 pro kationty. Výsledky ukázaly, že agarózové hydrogely mohou být použity, jako jedny ze standardních vrstev pro techniku difúzního gradientu v tenkém filmu pro široký rozsah anorganických a organických analytů.

Techniku difúzního gradientu v tenkém filmu ve své publikaci využívá i V. Řezáčová a spol. [86]. Studie je zaměřena na charakterizaci půd a jejich „čištění“ od látek, které narušují látkovou výměnu a nepříznivě ji ovlivňují (např. kovy). Pro tuto charakterizaci byla zvolena technika DGT, která umožňuje měření koncentrace látek *in situ* ve vodných systémech a měření hmotnostních toků látek *in situ* v sedimentech a půdách. Při experimentech byly využity dva typy polyakrylamidových gelů. Technika DGT se nyní využívá hlavně z důvodu měření stopových obsahů kovů a její výsledky pak mohou poskytnout informace o formách kovů, které jsou v systému sledovány. Množství kovu M (ng) vázaného během doby expozice t (s) v sorpčním gelu se obvykle stanovuje po eluci sorpčního gelu kyselinou dusičnou metodami atomové absorpční nebo emisní spektrometrie. Pozornost této práce je zaměřena na stanovení obsahu Cd, Cr, Cu, Ni a Pb. Výsledky jsou srovnány s výsledky získanými obvyklými vyluhovacími postupy.



Obrázek 28: Princip metody DGT a experimentální uspořádání při její aplikaci v půdách [86]

Obdobná problematika je zpracována i v publikaci P. Diviše a spol. [87], kdy je ovšem k technice DGT přidána ještě technika difúzní rovnováhy v tenkém filmu (DET – Diffusive Equilibrium in Thin films technique). Základem obou technik je ustálení rovnováhy a difúze sledovaných látek v tenkém filmu polyakrylamidového hydrogelu. Technikou DET byly měřeny hloubkové koncentrační profily kationtů a aniontů ve vodě a technikou DGT se pak stanovovaly průměrné koncentrace rozpuštěných látek ve vodných roztocích.



Obrázek 29: Schématické znázornění koncentračního gradientu ve vzorkovací jednotce DGT [87]

H. Martyniuk a J. Wieckowska [88] se zabývali studiem sorpce 17 kovových iontů na pevných a gelových formách huminových kyselin. Nejvyšší afinitu k aktivnímu centru huminových kyselin dokázaly mít ionty Pb, Ag, Hg, Cu, Ba a Cd. Ionty Ni, Co, Mn, Zn, Ca byly adsorbovány v menších množstvích, zatímco relativně lehké ionty o vysoké valenci, jako je Mg^{2+} , V^{4+} , Cr^{3+} , Al^{3+} a Fe^{3+} jsou adsorbovány v nejmenším množství. Oba typy gelů huminových kyselin selektivně adsorbují olovnaté ionty, zatímco gelové HK byly selektivní adsorbenty pouze pro Cr^{3+} a Al^{3+} ionty. Zkoumání IČ spekter ukázalo, že kovové ionty reagují především s karboxylovými skupinami HK. Čím vyšší je hodnota pH roztoku, tím vyšší je adsorpce iontů. Při $pH < 5$, jen část z celkového množství $-COOH$ skupin reaguje s kovovými ionty, ale při $pH > 5$ se do interakce vedle karboxylových skupin zapojují i skupiny fenolické a při $pH 6-7$ jsou všechny skupiny zapojeny do interakcí. Pb, Ag, Hg a Cu ionty jsou výjimečné, protože i při nízkých hodnotách pH reakčního roztoku ($pH < 5$) se do interakcí zapojují jejich fenolické skupiny.

M. Golmohamadi a K. J. Wilkinson [89] sledovali difúzi rozpuštěných látek v alginátovém hydrogelu v závislosti na jeho struktuře. Difúzní koeficienty byly měřeny pomocí fluorescenční korelační spektroskopie a byl sledován vliv náboje a velikosti, vliv iontové síly a pH, a hustoty gelu. Vliv iontové síly byl zkoumán na různých koncentracích (0,1 až 100 mM) a v kompozicích podle iontů (Na^+ , Ca^{2+} nebo jejich směsí). Difúzní koeficient se nijak významně neměnil s rostoucí iontovou silou, kdy byl jako difúzní sonda použit rhodamin 6G a jako protiont pak Na^+ ionty. Podobně, kolísání pH od 3 do 9 mělo také malý vliv na difúze R6G v gelu. Na druhé straně, přidavek Ca^{2+} mělo významný vliv na kompaktnost gelu, což vedlo k významnému snížení difúzního koeficientu. Velikost sondy a struktura gelu mají také významný vliv na difúzi. Z publikace je zřejmé, že difúzní transport v nabitých gelech jako je alginát může být důkladně chápán pouze tehdy, vezmeme-li v úvahu všechny účinky vyplývající z náboje rozpuštěné látky i gelu, velikosti rozpuštěné látky, struktury gelu a koncentračních gradientů.

Studie *F. Horkaye a spol.* [90] se zabývá hyaluronanem sodným, kdy autoři zkoumají jeho různé odlišnosti od jiných typů biopolymerů. Kombinují různé metody rozptylu a osmózy, aby kvantifikovali jeho dynamické a statické vlastnosti za téměř fyziologických podmínek. Měření poukazují na to, že molekuly HA zůstávají silně hydratované i při vysokých koncentracích soli. Toto chování se značně liší od polyelektrolytů s hydrofóbním polymerním řetězcem.

Další studie *P.A. Nettiho a spol.* [91] zkoumá estery kyseliny hyaluronové, které patří do nové třídy polymerů, které byly vyvinuty za účelem překonání citlivosti HA na vodu. V tomto

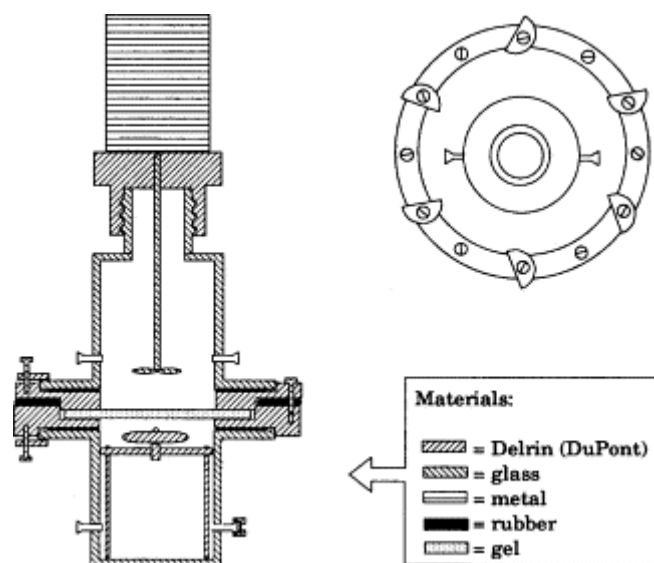
příspěvku byly zkoumány účinky substitučních skupin na transportní vlastnosti vodní páry. Byly stanoveny sorpční izotermy a reakční kinetika pro tři typy esterů HA (ethyl-, dodecyl- a benzylestery). Bylo zjištěno, že typ substituční skupiny má zásadní vliv na hydrofilitu polymeru.

Studie *J. Požar a spol.* [92] se zabývá reakcemi mezi polyallylamoniiovým kationtem (PAH) a polystyrensulfonátovým aniontem (PSS). Ty byly zkoumány v prostředí chloridů alkalických kovů (Li, Na, K, Rb, Cs), chloristanu sodného a chloridu tetraethylamonného prostřednictvím mikrokolorimetrie, potenciometrie, dynamického rozptylu světla a spektrofotometrie. Byl zkoumán vliv iontové síly a teploty. Reakce PAH a PSS při teplotě 25 ° C probíhala bez ohledu na to, o jaký chlorid alkalického kovu se jednalo, i při vyšších koncentracích než 1 mol dm⁻³.

Další studie *T. Yoshimury a spol.* [93] se zaměřuje na interakce kationtových povrchově aktivních látek a aniontového polymeru (PSS) byly charakterizovány několika technikami jako byly tenziometrie, fluorescenční spektroskopie, a dynamický rozptyl světla. Přidání povrchově aktivního činidla do roztoku aniontového polymeru při vysokých koncentracích vede k velmi různým efektům, a jejich vlastnosti se liší jak s ohledem na délku uhlovodíkového řetězce, tak s ohledem na počet řetězců povrchově aktivních látek. Také se potvrdilo, že čím delší je délka uhlovodíkového řetězce s povrchově aktivní látkou, tím silnější jsou pak interakce.

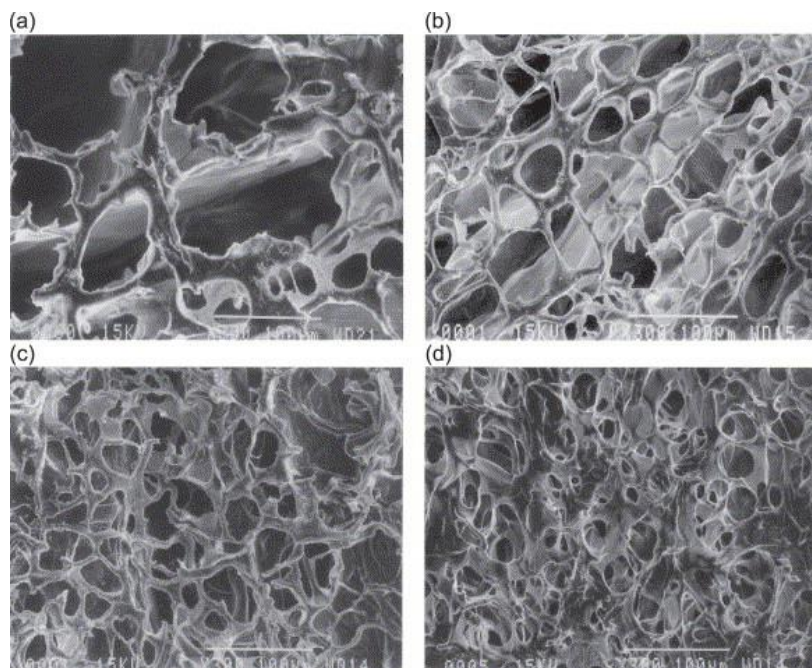
3.4 Využití difúzních technik pro stanovení difúzního koeficientu

J. Gutenwik a spol. [94] se ve svém článku zabývali difúzí proteinů (BSA a lysozym) přes agarózový gel metodou vertikálně uspořádané difúzní cely. Ta se v praxi často používá pro měření efektivní difúzní koeficientů proteinů. Tato studie byla zaměřena na vliv pH a iontové síly roztoku a poskytovala dobré výsledky, které se dají srovnat s jinými metodami, již při krátkých měřicích časech. Naměřené výsledky poukazují na to, že zvyšování pH roztoku vede k nepatrnému snižování difúzního koeficientu, ale naopak zvýšení iontové síly roztoku vede k poměrně velkému snížení difúzního koeficientu. Autoři také zmiňují poměrně dlouhou časovou náročnost difúzních experimentů.



Obrázek 30: Vertikální difúzní cely, pohled z boku a shora [94]

B. Falk a spol. [95] se ve své publikaci zaměřili na stanovení difúzního koeficientu analgetického léčiva paracetamolu (acetaminofen) v makroporézních chitosanových hydrogelech za použití metody diafragmové difúzní cely. Struktura pórů v hydrogelu se měnila v závislosti na množství chitosanu přidaného do vodného roztoku. Zjistili, že difuzivita se zvyšuje s teplotou a je silně závislá na vlastnostech pórů v hydrogelu.



Obrázek 31: Typická struktura chitosanových hydrogelů, Změna vlastností pórů v hydrogelu se v závislosti na obsahu chitosanu (v hm. %) ve vodném roztoku (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 5 hm. % [95]

M. Klučáková a M. Pekař [96] ve své publikaci studovali transport měďnatých iontů v huminovém gelu metodou difúzního páru. Byly použity tři typy gelů (A) základní huminový gel, (B) základní huminový gel se začleněnými Cu^{2+} ionty a (C) gel vysrážený z humátu sodného pomocí CuCl_2 . Difúzní pár byl připraven spojením dvou silikonových trubiček, z nichž jedna byla naplněna gelem bez iontů kovu (A) a druhá pak gelem s měďnatými ionty (B/C). Koncentrační profil na rozhraní gelů A a B byl spojitý, oproti tomu na rozhraní gelů A a C byl skokový. Bylo zjištěno, že difúze měďnatých iontů je závislá na podmínkách přípravy gelu. Efektivní difúzní koeficient naměřený pro difúzní pár gelu A/B byl vyšší než pro pár gelu A/C. Nejvyšší efektivní difúzní koeficient pro měďnaté ionty byl naměřen ve vodě, nižší pak pro šíření v základním gelu A, nižší pak u gelu B – až dvojnásobné snížení hodnot ve srovnání s vodou a nejnižší hodnota efektivního difúzního koeficientu byla zjištěna u gelu C.

M. Klučáková a M. Kalina [97] ve své další publikaci sledují transport a imobilizaci měďnatých iontů v hydrogelech na bázi huminových kyselin. Studovali vliv lišících se podmínek, při kterých byly HK izolovány a vliv surovin, ze kterých byly HK izolovány. Připravené huminové hydrogely obsahovaly různá množství reaktivních funkčních skupin (s různou afinitou ke kovovým iontům) a byl sledován vliv struktury a vlastností huminových kyselin na pohyblivost a imobilizaci měďnatých iontů v hydrogelové struktuře. Výsledné hodnoty efektivního difúzního koeficientu zahrnují vliv hydrogelové struktury a účinek reakce mezi Cu^{2+} ionty a huminovými kyselinami. Bylo také potvrzeno, že postup izolace huminových kyselin a jejich vlastnosti mají vliv na difuzivitu Cu^{2+} iontů v hydrogelu.

P. Sedláček a spol. [98] ve své další publikaci využívali metodu horizontální difúzní cely k měření difúzních parametrů organických barviv v agarózovém hydrogelu. Stanovovali difúzní koeficienty vybraných zásaditých organických barviv ve vodném roztoku a hledali korelaci mezi difúzním koeficientem barviva ve vodném roztoku a jeho molární hmotností. Došli k závěru, že se zvyšující se molární hmotností barviva klesá difúzní koeficient. Dále také sledovali vliv teploty na hodnotu difúzního koeficientu. Zjistili, že při nižší teplotě (25 °C) byly naměřené hodnoty difúzního koeficientu nižší než při 40 °C.

Další publikace, která se věnuje problematice difúzní cely, je další článek od *P. Sedláček a spol.* [99], kde je nahlíženo na problematiku použití jednoduchých difúzních technik ke studiu reaktivity a transportních procesů v huminových hydrogelech. Je sledována difúze měďnatých iontů z roztoku do huminových matric. Jejich výsledky pak shrnují difúzní koeficienty, které charakterizují příslušné studované systémy. Své výsledky pak také velice úspěšně porovnávají s teoretickými modely, které slouží pro popis difúzních experimentů.

4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce je stanovení fundamentálních difúzních parametrů v hydrogelových maticích s přidavkem různých polyelektrolytů přírodního i syntetického charakteru. Následně bude ověřen vliv zvolených polyelektrolytů a změny jejich koncentrace v agarózovém hydrogelu na transportní a bariérové vlastnosti výsledných hydrogelů.

Hlavní cíle této diplomové práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- vypracování literární rešerše na téma možnosti studia reaktivity a bariérových vlastností polyelektrolytů různými technikami
- výběr polyelektrolytů a vhodných difúzních sond pro realizaci difúzních experimentů
- charakterizace hydrogelů s přidavkem polyelektrolytu s ohledem na transportní a bariérové vlastnosti
- posouzení vlivu interakcí polyelektrolyt/difúzní sonda na finální bariérové vlastnosti hydrogelů

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie a přístroje

- agaróza (Type II, Medium EEO, Sigma-Aldrich)
 - alginát sodný (SAFC)
 - lignitické huminové kyseliny (vlhkost 6,79 %, popel 28,92 %, 2008, lokalita Mikulčice, důl Mírov)
 - hydroxid sodný (mikroperly, Lach-Ner)
 - kyselina hyaluronová 1 400–1 600 kDa (Contipro Group)
 - kyselina chlorovodíková (35 %, PENTA)
 - polysytremsulfonát sodný (Sigma-Aldrich)
 - rhodamin 6G (Sigma-Aldrich)
 - silikonový tuk na zábrusy LUKOSAN (Verkon)
 - destilovaná voda
-
- analytické váhy (Scaltec Instruments)
 - automatický titrátor (888 Titrand, Metrohm)
 - difúzní cela (PermeGear Inc.)
 - lihový teploměr
 - vícemístná magnetická míchačka (Variomag Power Direct)
 - pH metr Seven Easy (Mettler Toledo)
 - reometr HR-2 (Discovery Hybrid Rheometer, TA Instruments)
 - spektrofotometrické sondy, zdroje a detektory světla, software (Ocean Optics)
 - UV-VIS spektrofotometr (Hitachi U-3300)
 - UV-VIS spektrofotometr (Varian Cary50)

5.2 Příprava vzorků pro difúzní experimenty

V rámci studia transportních a bariérových vlastností vybraných polyelektrolytů v hydrogelových maticích pomocí difúzních technik byla studována interakce s kationaktivním barvivem rhodaminem 6G.

5.2.1 Příprava zásobního roztoku difúzní sondy

Před započítím celého experimentu bylo nutné si připravit zásobní roztok používaného barviva. V případě této diplomové práce byl jako organické barvivo (*difúzní sonda*) použit rhodamin 6G. Zásobní roztok R6G byl připraven následujícím způsobem:

0,01 g práškového rhodaminu 6G bylo naváženo na analytických vahách, kvantitativně převedeno do odměrné baňky a rozpuštěno v 1 litru destilované vody. Poté bylo do odměrné baňky vhozeno magnetické míchadlo a roztok byl ponechán na magnetické míchačce míchat minimálně 2 hodiny. Požadovaný zásobní roztok R6G měl výslednou koncentraci 0,01 g·l⁻¹.

5.2.2 Příprava zásobního roztoku zkoumané látky

Dále bylo před započítím celého experimentu ještě nutné si připravit zásobní roztoky vybraných polyelektrolytů (PE). Jako tyto látky byly použity přírodní látky (*huminové kyseliny*,

alginát, kyselina hyaluronová) a syntetická látka (*polystyrensulfonát*). V případě ALG, HyA a PSS byl postup přípravy zásobních roztoků následující:

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství polyelektrolytu, kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno vodou po rysku. Následně byl roztok po dobu 24 h promícháván na magnetické míchačce, aby došlo k dokonalému rozpuštění. Finální koncentrace zásobních roztoků polymerů byly poté 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 a 50,0 g·l⁻¹. Nejvyšší koncentrace zásobního roztoku bylo dosaženo pouze pro ALG, u PSS se připravoval zásobní roztok pouze o koncentraci 1,0 g·l⁻¹ a u HyA se došlo jen ke koncentraci 10,0 g·l⁻¹, neboť zásobní roztok o vyšší koncentraci již bylo velmi problematické připravit.

V případě HK byl postup odlišný: na analytických vahách bylo naváženo 0,1 g HK, kvantitativně převedeno do odměrné baňky a rozpuštěno v 50 ml 0,5 M hydroxidu sodného. Následně byl roztok po dobu 24 h promícháván na magnetické míchačce rychlostí 250 otáček/min, aby došlo k dokonalému rozpuštění HK. Roztok byl poté okyselen 1 M kyselinou chlorovodíkovou na pH = 7 a odměrná baňka poté doplněna destilovanou vodou na výsledný objem 100 ml. Finální koncentrace zásobního roztoku HK poté byla 1,0 g·l⁻¹.

5.2.3 Příprava agarózových hydrogelů s přidavkem polyelektrolytu

Cílem přípravy agarózových hydrogelů s přidavkem polyelektrolytu bylo získat vhodné médium pro studium reaktivity biopolymerů a syntetických látek. Jako vhodná matrice byla zvolena agaróza, která je téměř chemicky inertní z hlediska afinity k iontovým sloučeninám a zároveň disponuje termoreverzibilní schopností gelace. Příprava agarózových hydrogelů, které byly použity na difúzní experimenty, byla provedena následujícími způsoby:

- Potřebné množství agarózy (AG) bylo naváženo na analytických vahách a následně převedeno do kádinky s 10,0 ml destilované vody (DV). Poté byla kádinka za občasného promíchání skleněnou tyčinkou zahřívána na teplotu 85 °C. Teplota byla kontrolována lihovým teploměrem. Po zahřátí na 85 °C (kdy došlo k úplnému rozpuštění agarózy) byl roztok ještě za horka nalit do kruhové teflonové formy opatřené ze spodní strany sklíčkem. Po nalití byla forma i z vrchní strany opatřena sklíčkem tak, aby se v horkém roztoku nevytvořily vzduchové bubliny a sklíčka byla poté z obou stran uchycena kovovou svorkou. Gel byl ponechán k tuhnutí při laboratorní teplotě po dobu minimálně 45 minut. Agarózový gel tuhnoucí v teflonové formě je zobrazen na fotografii (*Příloha 1*).
- V případě agarózového gelu s přidavkem polyelektrolytu bylo do kádinky s agarózou a destilovanou vodou ještě přidán předem vypočítaný objem polyelektrolytu. Poté byl celý postup totožný jako v případě agarózového gelu bez přidavku polyelektrolytu.

Přehled vypočítaných navážek a objemů na přípravu agarózových hydrogelů s přidavkem polyelektrolytu:

- a) 1 hm. % agarózového gelu + 0,000 hm. % polyelektrolytu
 - 10 ml DV+ 0,1 g AG
- b) 1 hm. % agarózového gelu + 0,002 hm. % polyelektrolytu
 - 9,8 ml DV+ 0,2 ml roztoku PE (1,0 g·l⁻¹) + 0,1 g AG

- c) 1 hm. % agarózového gelu + 0,005 hm. % polyelektrolytu
 - 9,5 ml DV+ 0,5 ml roztoku PE ($1,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) + 0,1 g AG
- d) 1 hm. % agarózového gelu + 0,010 hm. % polyelektrolytu
 - 9,0 ml DV+ 1,0 ml roztoku PE ($1,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) + 0,1 g AG
- e) 1 hm. % agarózového gelu + 0,025 hm. % polyelektrolytu
 - 9,5 ml DV+ 0,5 ml roztoku PE ($5,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) + 0,1 g AG
- f) 1 hm. % agarózového gelu + 0,050 hm. % polyelektrolytu
 - 9,0 ml DV+ 1,0 ml roztoku PE ($5,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) + 0,1 g AG
- g) 1 hm. % agarózového gelu + 0,100 hm. % polyelektrolytu
 - 9,0 ml DV+ 1,0 ml roztoku PE ($10,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) + 0,1 g AG
- h) 1 hm. % agarózového gelu + 0,200 hm. % polyelektrolytu
 - 9,0 ml DV+ 1,0 ml roztoku PE ($20,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) + 0,1 g AG
- i) 1 hm. % agarózového gelu + 0,500 hm. % polyelektrolytu
 - 9,0 ml DV+ 1,0 ml roztoku PE ($50,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) + 0,1 g AG

5.3 Příprava difúzních experimentů ve Stokesově diafragmové difúzní cele

Před započítáním měření byly styčné plochy difúzní cely a teflonové formy namazány speciálním silikonovým tukem na zábrusy, a to z důvodu, aby bylo zajištěno dokonalé utěsnění celého experimentu a aby proces difúze probíhal pouze skrz oblast agarózového hydrogelu. Po dokonalém procesu gelace byla opatrně oddělána obě sklíčka a gel byl i s teflonovou formou umístěn mezi komory difúzní cely tak, aby nedošlo k vypadnutí hydrogelu z formy. Do každé komory difúzní cely bylo umístěno magnetické míchadlo, poté byla cela umístěna do připraveného držáku na vícemístné magnetické míchačce, která byla nastavena na hodnotu 250 RPM. Dále bylo do jedné komory difúzní cely přes nálevku nalito 60 ml předem připravené difúzní sondy (R6G) a do druhé komory nalito 60 ml destilované vody. Roztoky musely být důsledně nalévány do obou komor zároveň, aby nedošlo ke zvýšení tlaku na jednu stranu gelu a tím pádem k jeho vypadnutí z teflonové formy. Poté byla do komory obsahující destilovanou vodu ponořena UV-VIS sonda tak, aby v měřicím okénku nebyla vzduchová bublina. UV-VIS sonda byla dále napojena na zdroj světla a detektor, který byl dále propojen s počítačem. Difúzní experiment ve Stokesově difúzní cele je znázorněn na fotografii (*Příloha 2*).

5.3.1 Nastavení softwaru SpectraSuite

Před započítáním celého experimentu je nutné zapnout (*přibližně po dobu jedné hodiny*) zdroj záření, aby byla zaručena maximální intenzita zdrojového paprsku. Po ponoření UV-VIS sondy do destilované vody byl dále spuštěn počítačový software SpectraSuite. Pomocí tohoto softwaru byl vybrán vhodný integrační čas, a to z důvodu, aby byla intenzita píku dostatečně vysoká a zároveň, aby pík nebyl shora useknutý. Dále byl proměřen referenční vzorek, kterým byla destilovaná voda (základní linie) a poté spektrum s odpojeným optickým kabelem. Po odečtení obou spekter byl eliminován šum detektoru. Nyní by mělo mít

spektrum v ideálním případě v celém rozsahu nulovou absorbancí. Jednotlivá spektra byla ukládána automaticky pomocí softwaru do textových souborů v půlhodinových intervalech. Pro jistotu byla vždy provedena kontrola, zda se započalo ukládání ve formě textových souborů. Obě hrdla difúzních komor byla následně obmotána parafilmem tak, aby nedocházelo k odpařování rozpouštědla. V průběhu měření můžeme pozorovat nárůst hodnoty absorpance při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu čili v případě R6G při vlnové délce 525 nm. Průběh nastavení softwaru SpectraSuite je zobrazen na obrázku (Příloha 3).

5.3.2 Stanovení fundamentálních difúzních parametrů

Naměřená data z programu SpectraSuite, která měla podobu textových souborů, byla poté převedena do MS Excel pomocí makrosouboru. Tato surová data (Příloha 5) bylo nutné vyhladit, a k tomu byl použit program Origin, do kterého byla nakopírována data z MS Excel a ta byla poté přes daný příkaz převedena do vyhlazených křivek (Příloha 6). Tato vyhlazená data poté byla zkopírována do nového listu v MS Excelu. Takto upravená data již bylo možné dále zpracovávat. U všech dat byla odečtena hodnota absorpance při vlnové délce 525 nm a ta byla poté vynesena do grafu v závislosti na času difúzního experimentu. Lineární části grafů pak byly proloženy přímkami a z jejich směrnic byly vypočítány hodnoty fundamentálních difúzních parametrů, které charakterizují difúzní procesy. Jedná se konkrétně o [52]:

- *efektivní difúzní koeficient*, který charakterizuje proces ustálené difúze barviva do přijímací cely, tj. proces difúze od okamžiku, kdy už všechno barvivo prošlo hydrogelem a kdy už případné interakce mezi difúzní sondou a aktivní látkou v hydrogelu nemají na tento průchod žádný vliv. Jde vlastně o difúzní koeficient, který je obohacen o vliv tortuozity a porozity, skrývá v sobě však také rozdělovací koeficient ε .

$$D_{eff} = \left(\frac{dn}{dt} \right) \cdot \left(\frac{l}{\Delta C_{10}} \right), \quad (12)$$

kdy dn/dt představuje směrnicí lineární části grafu závislosti molární koncentrace barviva v přijímací cele na čase, l je tloušťku gelu a ΔC_{10} je rozdíl koncentrace barviva v přijímací a zdrojové difúzní cele.

- *čas průchodu* t_p , který představuje čas, který je potřebný pro penetraci difúzní sondy skrz hydrogelovou strukturu

$$t_p = \frac{l^2}{6 \cdot D_a}, \quad (13)$$

kdy l představuje tloušťku hydrogelu a D_a je pak zdánlivý difúzní koeficient.

- *nasorbované množství barviva v hydrogelu n_{R6G} po ukončení experimentu*

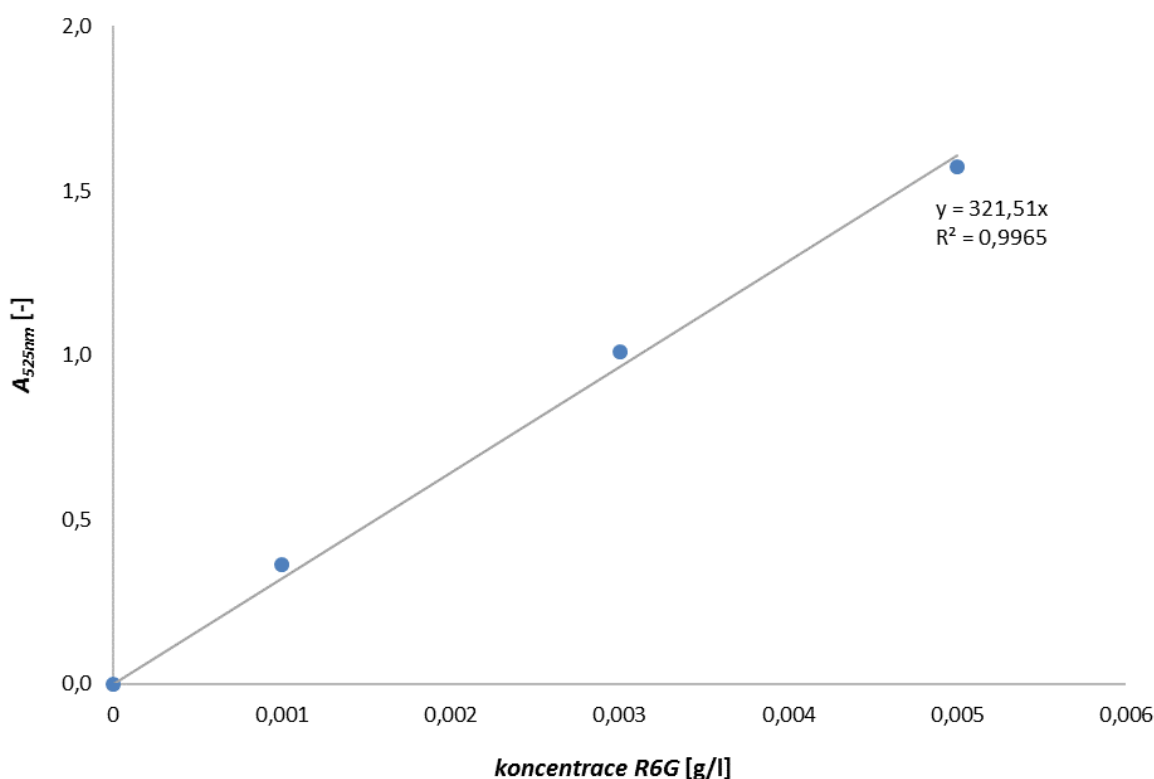
$$n_{R6G} = (c_0 - c_z - c_p) \cdot V, \quad (14)$$

kdy c_0 představuje koncentraci zásobního roztoku R6G, c_p a c_z pak koncentraci roztoku v přijímací a zdrojové difúzní cele po ukončení difúzního experimentu a V je pak celkový objem roztoku v difúzní cele.

5.4 Charakterizace zkoumaných látek

V této kapitole jsou probrány metody, které sloužily k charakterizaci jednotlivých použitých materiálů. Zásobní roztoky polyelektrolytů byly poté charakterizovány pomocí přímých a zpětných titrací a mechanické vlastnosti agarózových hydrogelů s přidavkem polyelektrolytu byly prozkoumány pomocí oscilačních testů (reologie).

Jednou ze základních charakteristik zásobního roztoku difúzní sondy bylo proměření jeho UV-VIS spektra. Příprava zásobního roztoku difúzní sondy probíhala dle postupu popsaného v kapitole 5.2.1. Dále byla pak ze zásobního roztoku o koncentraci $0,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ vytvořena koncentrační řada o koncentracích R6G ($0,01$; $0,007$; $0,005$; $0,003$; $0,001 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Tato řada byla poté proměřena na přístroji VARIAN (*Příloha 10*) v rozsahu vlnových délek $250\text{--}800 \text{ nm}$ (z důvodu výpočtu přesné koncentrace roztoku R6G v přijímací a zdrojové difúzní cele) a zároveň také na spektrofotometrických sondách (z důvodu určení molárního absorpčního koeficientu, díky kterému pak bylo možné naměřenou absorbanci přepočítat na koncentraci). Jako základní linie byla v obou případech použita destilovaná voda.



Obrázek 32: Kalibrační závislosti pro zásobní roztok R6G (měřeno na spektrofotometrických sondách)

Dále byla na přístroji VARIAN proměřena UV-VIS spektra všech sesbíraných vzorků po experimentech ve Stokesově difúzní cele, a to z důvodu určení přesné koncentrace organického barviva, které se zachytilo v gelu. Předpokládáme, že by měla s rostoucí koncentrací PE růst koncentrace barviva v gelu, ale jak je diskutováno dále, není tomu tak u všech zvolených polyelektrolytů. Průběh měření na spektrofotometru VARIAN je znázorněn na obrázku (*Příloha 11*).

5.4.1 Stanovení celkové kyselosti zkoumaných látek

Jako další charakterizační metoda byla použita přímá a zpětná titrace zásobních roztoků polyelektrolytů. Pro toto měření byl použit automatický titrátor (*Příloha 12*), který byl propojen s PC, do kterého byly pomocí softwaru TIAMO (*Příloha 13*) automaticky zaznamenány všechny naměřené hodnoty pH v závislosti na přídávku titračního činidla – NaOH (*v případě přímé titrace*) nebo HCl (*v případě zpětné titrace*). Výsledkem tohoto měření bylo pak stanovení celkové kyselosti jednotlivých polyelektrolytů.

Přímá titrace

Bylo naváženo 0,1 g polyelektrolytu, který byl poté rozpuštěn ve 100 ml demineralizované vody a ponechán míchat po dobu 24 hodin, aby došlo k dokonalému rozpuštění. Poté byl připraven 0,05 mol·dm⁻³ roztok NaOH, kterým byl poté roztok PE titrován. Celkový přidaný objem roztoku hydroxidu sodného byl vypočítán na přibližně 30 ml. Přídavek titračního činidla byl automaticky zvolen pomocí softwaru přístroje a experiment automaticky ukončen, jakmile pH dosáhlo hodnoty 12,0. Při tomto experimentu byla měřena hodnota pH.

Zpětná titrace

Bylo naváženo 0,1 g polyelektrolytu, který byl poté rozpuštěn v 50 ml 0,1 mol·dm⁻³ NaOH a ponechán míchat po dobu 24 hodin, aby došlo k dokonalému rozpuštění. Poté byl připraven 0,1 mol·dm⁻³ roztok HCl, kterým byl poté roztok PE titrován. Celkový přidaný objem roztoku kyseliny chlorovodíkové byl vypočítán na přibližně 60 ml. Přídavek titračního činidla byl automaticky zvolen pomocí softwaru přístroje a experiment automaticky ukončen, jakmile pH dosáhlo hodnoty 2,0. Při tomto experimentu byla měřena hodnota pH. Celkovou kyselost vybraných přírodních a syntetických polyelektrolytů lze pak určit ze spotřeby titračního činidla čili HCl, která byla použita na titraci přebytku NaOH a celkové spotřeby titračního činidla, které bylo použito na vytitrování kyselých skupin vybraných PE.

Naměřené hodnoty pH v závislosti na přídávku titračního činidla byly poté zderivovány v programu ORIGIN a tyto hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti na spotřebě titračního činidla. Z grafu byly poté odečteny hodnoty minima inflexních bodů a nim odpovídající spotřeby HCl. Rozdíl obou spotřeb byl následně použit ve vzorci pro výpočet celkové kyselosti zvolených polyelektrolytů (15).

$$\text{celková kyselost} = \frac{V_{\text{TČ}} \cdot c_{\text{TČ}}}{m_{\text{PE}}} \cdot \frac{100}{\text{čistota}_{\text{PE}}}, \quad (15)$$

kdy $V_{\text{TČ}}$ představuje rozdíl spotřeb titračního činidla v inflexních bodech, $c_{\text{TČ}}$ je koncentrace titračního činidla, m_{PE} je navážka zvoleného polyelektrolytu, $\text{čistota}_{\text{PE}}$ je pak čistota zvoleného polyelektrolytu.

Naměřené titrační křivky jsou zobrazeny a výsledky diskutovány v kapitole 6.1.1.

5.4.2 Měření viskoelastických vlastností agarózových hydrogelů

Velice důležitou metodou pro charakterizaci agarózových hydrogelů jsou reologická měření, která probíhala na reometru od společnosti TA Instruments (*Příloha 14*). Tato měření se prováděla pomocí dvou jednoduchých typů oscilačních testů. Prvním typem byl test s konstantní frekvencí oscilací a měnící se amplitudou deformace, který sloužil pro určení lineární viskoelastické oblasti (LVO), druhým typem pak byl test s konstantní amplitudou deformace a měnící se frekvencí oscilací.

Všechny experimenty byly prováděny při teplotě 25 °C (konstantní teplota zajištěna Peltierovou deskou s průtokovým termostatem) a použitou geometrií byl ocelový senzor typu deska-deska o průměru 20 mm. Pro test s konstantní frekvencí oscilací a měnící se amplitudou deformace bylo nastavení následující: rozsah amplitudy deformace od $\gamma = 0,1 \%$ do $\gamma = 100 \%$ a frekvence oscilací $f = 1$ Hz (měření mělo vzestupnou tendenci). Pro měření viskoelastických vlastností agarózových hydrogelů byl použit oscilační test s konstantní amplitudou deformace a měnící se frekvencí oscilací. Tyto testy byly prováděny při amplitudě deformace $\gamma = 0,1 \%$ (tato hodnota vybrána dle LVO), rozsahu frekvencí od $f = 0,01$ Hz do $f = 20$ Hz (měření mělo vzestupnou tendenci).

Všechny proměřené vzorky agarózových hydrogelů pak byly charakterizovány komplexním modulem G^* (vypočítán pomocí elastického modulu G' a viskózního modulu G'') dále pak pomocí komplexní viskozity η^* . Vzorec pro výpočet komplexního modulu G^* :

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (16)$$

Naměřené frekvenční testy s konstantní amplitudou deformace a měnící se frekvencí oscilací jsou zobrazeny a výsledky diskutovány v kapitole 6.1.2.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

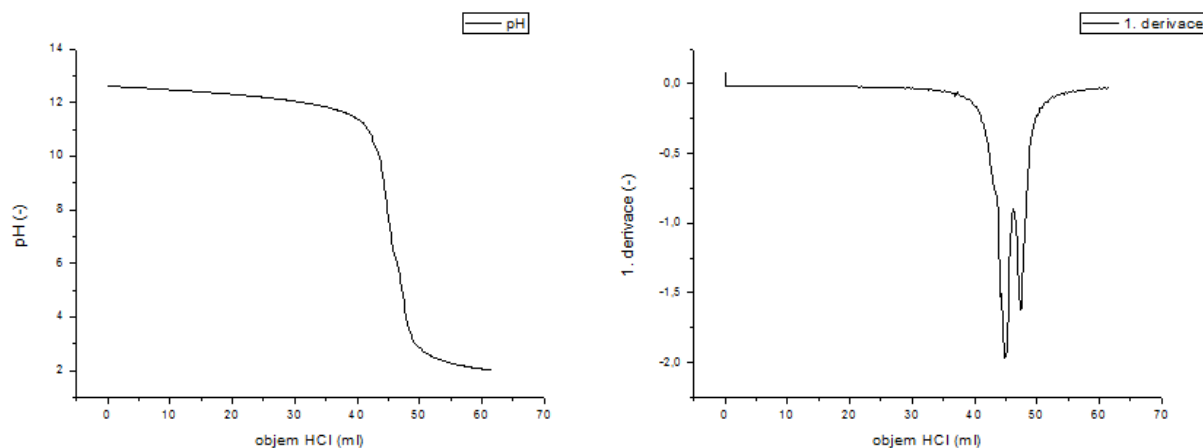
6.1 Charakterizace zkoumaných látek

6.1.1 Stanovení celkové kyselosti vybraných polyelektrolytů

Stanovení celkové kyselosti neboli titračním experimentům pomocí přímé (PT) i zpětné potenciometrické titrace (ZT) byly podrobeny roztoky všech přírodních (ALG, HyA i HK) i syntetických látek (PSS), které byly připraveny dle postupu, který byl popsán v kapitole 5.4.1. Přímá i zpětná titrace umožňují stanovit jiný typ kyselých funkčních skupin. Samozřejmě i rychlost přidávku titračního činidla má vliv na výslednou kyselost.

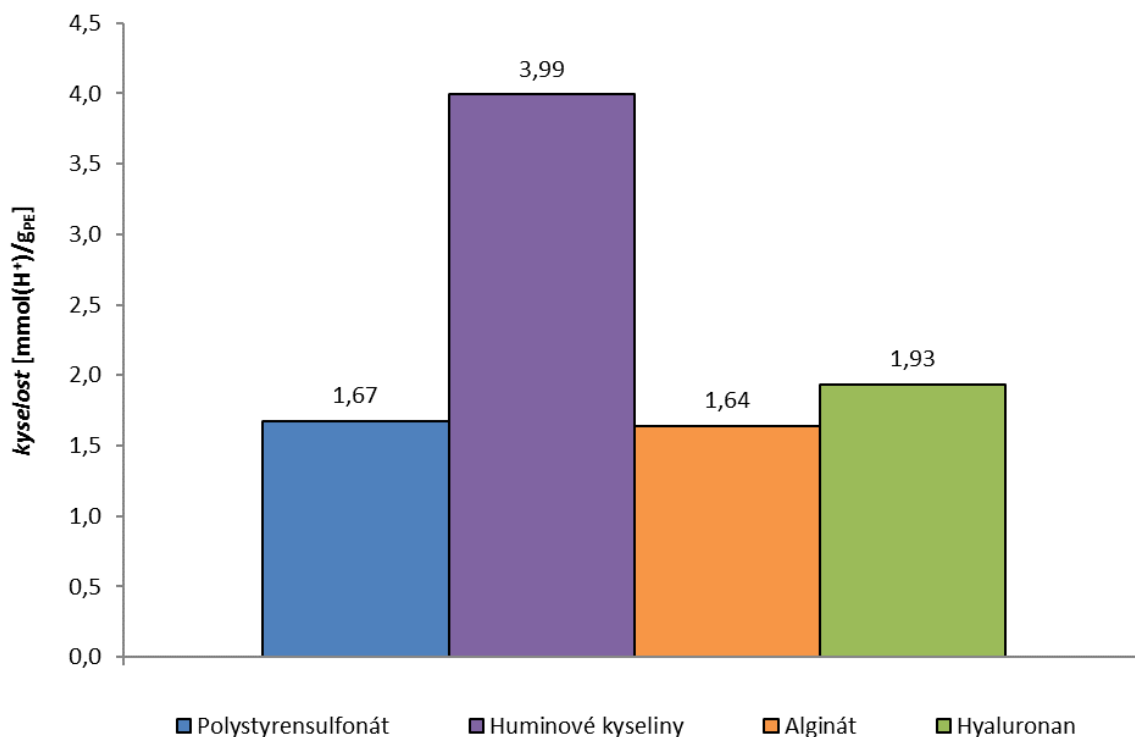
Při pomalé (přímé) titraci docházelo nejprve vlivem nárůstu objemu titračního činidla (NaOH) k natahování původně „sbaleného“ řetězce polyelektrolytu rozpuštěného ve vodě, až poté docházelo k disociaci a tím pádem nebyly některé funkční skupiny zcela disociovány. U huminových kyselin docházelo v demineralizované vodě pouze k rozdispergování, až vlivem přidávku hydroxidu sodného došlo k dokonalému rozpuštění (*pozn. v NaOH jsou HK rozpustné, ve vodě nikoli*). Naproti tomu u rychlejší (zpětné) titrace byl již řetězec polyelektrolytu v roztoku „natažen“ vlivem nadbytku rozpouštědla (NaOH) a následně okyselenán titračním činidlem (HCl) až do okamžiku, než byly veškeré funkční skupiny polyelektrolytu disociovány.

Na následujících grafech, které byly vytvořeny pomocí programu ORIGIN (Obrázek 33), je znázorněn průběh titračního experimentu u zpětné titrace roztoku huminových kyselin. Na grafu vlevo můžeme vidět závislost naměřené hodnoty pH na přidávku titračního činidla, na grafu vpravo je pak znázorněna první derivace naměřených hodnot pH v závislosti na přidávku titračního činidla. Na grafu vpravo jsou patrné dva píky, levý pík patří hydroxylové funkční skupině, která je méně kyselá než skupina karboxylová (pravý pík), na jejíž vytitrování je nutná vyšší spotřeba titračního činidla.



Obrázek 33: Závislost pH (vlevo) a 1. derivace (vpravo) na přidávku titračního činidla (HCl)

Hlavním výstupem z titračních experimentů byly hodnoty kyselosti přepočítané na čistý polyelektrolyt pro jednotlivé PE, které byly vypočítány ze zpětné titrace pomocí rovnice (15). Na níže uvedeném grafu (Obrázek 34) jsou znázorněny hodnoty kyselostí pro vybrané polyelektrolyty. Celková kyselost polyelektrolytu je pak vyjádřena v mmol H^+ na 1 gram polyelektrolytu.



Obrázek 34: Vypočítané hodnoty kyselostí pomocí zpětné titrace pro všechny polyelektrolyty

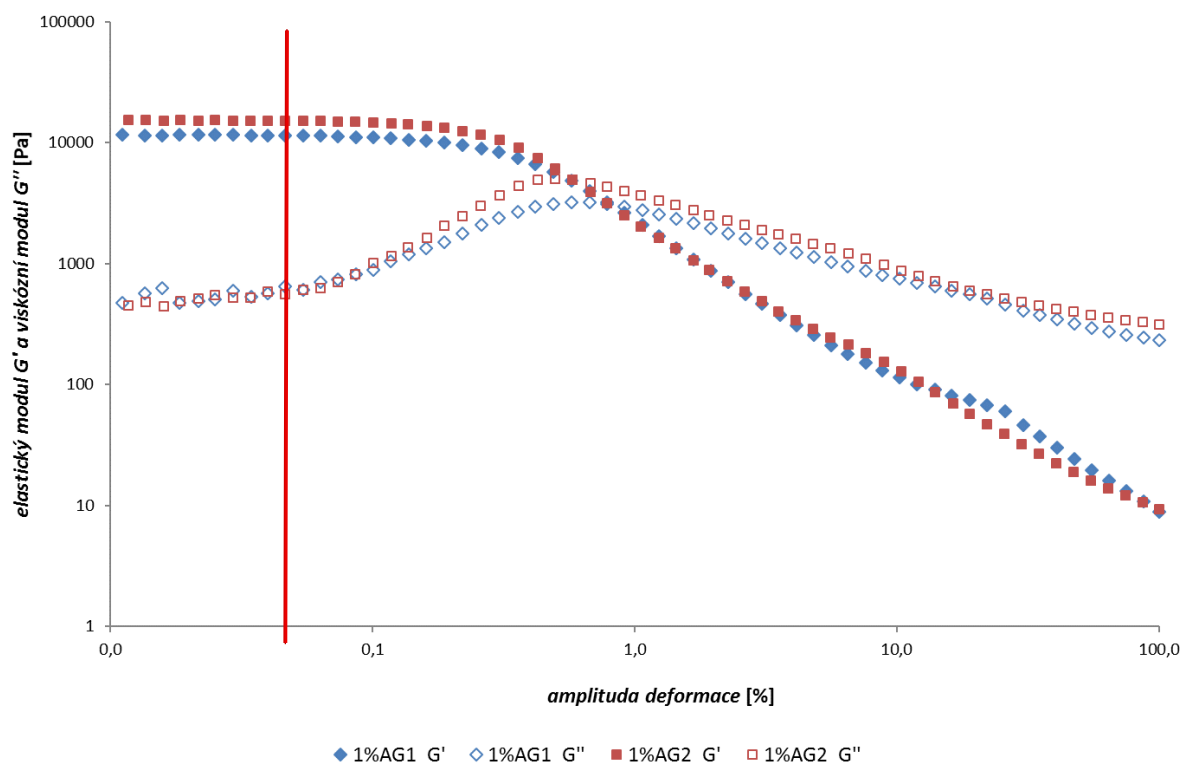
Nejvyšší hodnoty kyselosti dosahují dle očekávání huminové kyseliny, neboť mají ve své struktuře nejvíce kyselých funkčních skupin, které mohou být disociovány. Také struktura HK je výrazně složitější než struktury ostatních polyelektrolytů, které mají výrazně nižší celkovou kyselost.

Co se týče vlivu celkové kyselosti na transportní a bariérové vlastnosti, má na ně zcela zásadní vliv u difúzních experimentů pro agarózové hydrogely s přidavkem huminových kyselin, kde je interakce s organickým barvivem způsobena právě vysokou hodnotou kyselosti. U agarózových hydrogelů s přidavkem PSS, ALG a HyA vyšly hodnoty kyselosti velice podobně, interakce s difúzní sondou tedy není dána kyselostí, ovšem jejich odlišnou nábojovou hustotou, případně jinými specifickými vlastnostmi. Proto výsledky titračních experimentů vyšly velice podobně, ovšem výsledky reologických a difúzních experimentů byly odlišné.

6.1.2 Měření viskoelastických vlastností agarózových hydrogelů

Stanovení viskoelastických vlastností agarózových hydrogelů probíhalo na reometru HR-2 pomocí jednoduchých oscilačních testů s konstantní amplitudou deformace a měnící se frekvencí oscilací. Testy byly prováděny na ocelovém senzoru deska-deska o průměru 20 mm a při konstantní teplotě měření a to 25 °C. Měření bylo zaměřeno na vliv přidavku různě koncentrovaných polyelektrolytů do 1 hm. % agaróзовého hydrogelu a na to, jak jejich přítomnost ovlivňuje mechanické vlastnosti výsledného hydrogelu. Změna mechanických vlastností by totiž měla za následek změnu bariérových i transportních vlastností jednotlivých hydrogelů, neboť při změně viskoelastického charakteru gelu se také mění jeho transportní vlastnosti. Reologická měření jsou tedy hlavním předpokladem pro komplexní charakteristiku agarózových hydrogelů.

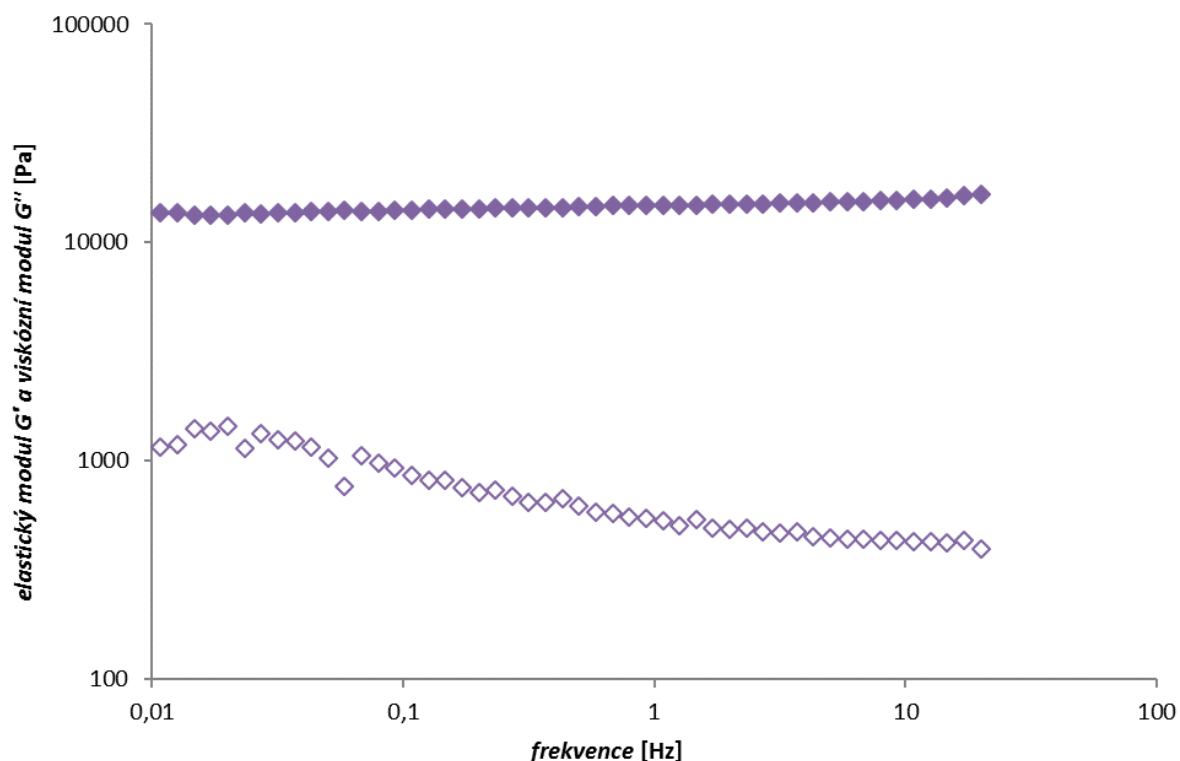
Prvním testem, kterému byly agarózové hydrogely vystaveny, byl test s konstantní frekvencí oscilací a měnící se amplitudou deformace (*strain sweep*). Hlavním cílem tohoto testu bylo určení lineární viskoelastické oblasti. Tato oblast pak charakterizuje vratné a nevratné deformace hydrogelu a zároveň je odezva viskoelastických modulů nezávislá na zvolené amplitudě deformace. Je jedním z fundamentálních kritérií pro posuzování viskoelastického chování gelů. Na následujícím grafu (Obrázek 35) je tato oblast patrná ihned na počátku experimentu, neboť jsou vůči sobě elastické a viskózní moduly prakticky rovnoběžné a nedá se pozorovat žádná zásadnější změna jejich odezvy v závislosti na vkládané amplitudě deformace (*konec LVO vyznačuje červená svislá čára*).



Obrázek 35: Oscilační test s konstantní frekvencí oscilací a měnící se amplitudou deformace pro 1 hm. % agarózový gel (měření provedeno 2x)

Druhým testem, kterému byly agarózové hydrogely vystaveny a z jejichž výsledku byly vyvozeny závěry o viskoelastickém chování jednotlivých hydrogelů, byl také oscilační test, ale nyní s konstantní amplitudou deformace a měnící se frekvencí oscilací (*frequency sweep*), tzv. frekvenční test. V tomto případě byla na vzorek aplikována konstantní amplituda deformace $\gamma = 0,1 \%$, neboť do této hodnoty se odezva viskoelastických modulů prakticky neměnila. Tato hodnota byla vhodně vybrána, dle *strain sweep* testu tak, aby nedošlo k nevratné deformaci vzorku.

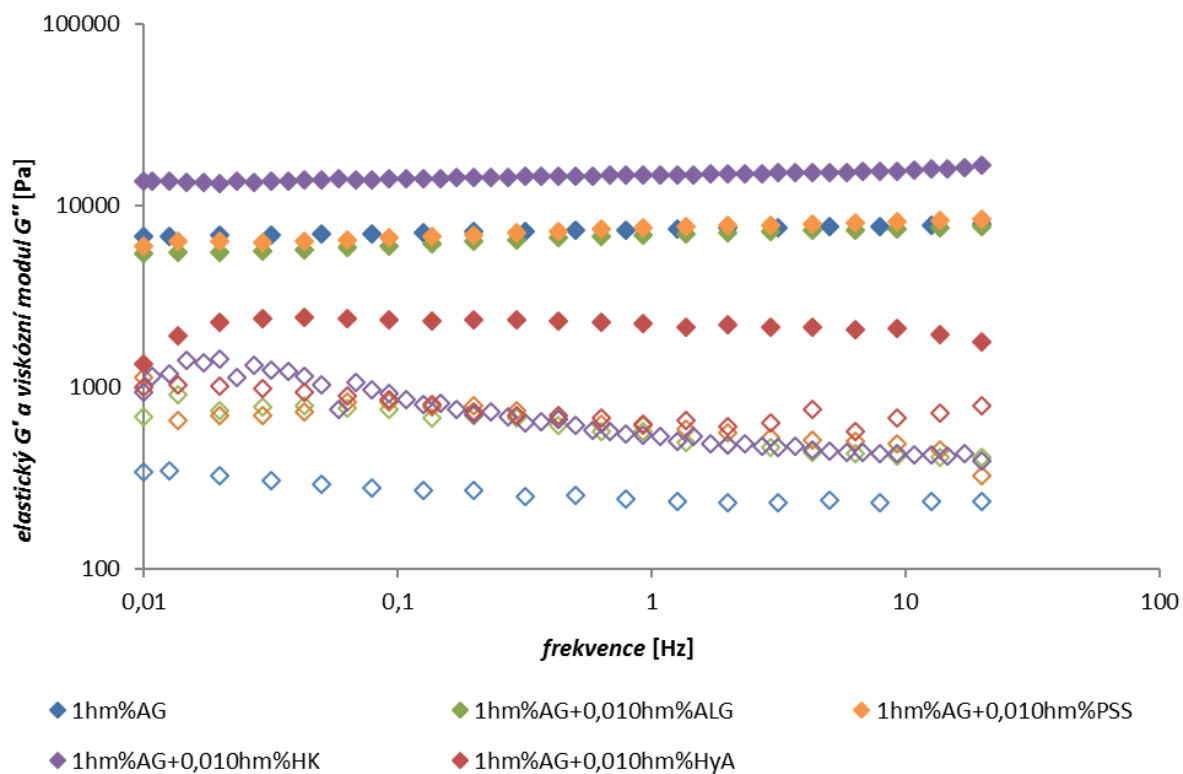
Výsledkem tohoto frekvenčního testu jsou grafické závislosti elastického modulu G' a viskózního modulu G'' na frekvenci oscilací. Ze vzorového grafu pro 1 hm. % agarózový gel s přídatkem 0,010 hm. % huminových kyselin (Obrázek 36) je patrné, že elastický modul výrazně převyšuje nad modulem viskózním a že se jeho hodnota pro daný vzorek prakticky nemění v závislosti na frekvenci oscilací, z čehož lze usuzovat, že se strukturně opravdu jedná o gel s plně vytvořenou zesíťovanou strukturou s viskoelastickým charakterem s převahou elasticity.



Obrázek 36: Závislost elastického modulu G' (plné symboly) a viskózního modulu G'' (prázdné symboly) na frekvenci oscilací pro 1 hm. % agarózové gely s přidavkem 0,010 hm. % huminových kyselin

Nejdůležitějším bodem celého reologického měření bylo sledování vlivu přidavku různě koncentrovaných polyelektrolytů na výsledné viskoelastické vlastnosti agarózových hydrogelů. Výchozí koncentrace agarózy v agarózovém hydrogelu byla pro všechna měření stejná a to 1 hm. %. Přidavky se poté u jednotlivých polyelektrolytů lišily v závislosti na difúzních experimentech. U polystyrensulfonátu a huminových kyselin se reologická měření prováděla pouze do koncentrace 0,010 hm. % PSS/HK, u hyaluronanu se pokračovalo až ke koncentraci 0,100 hm. % HyA a u alginátu se došlo až do koncentrace 0,500 hm. % ALG v 1 hm. % agarózovém gelu.

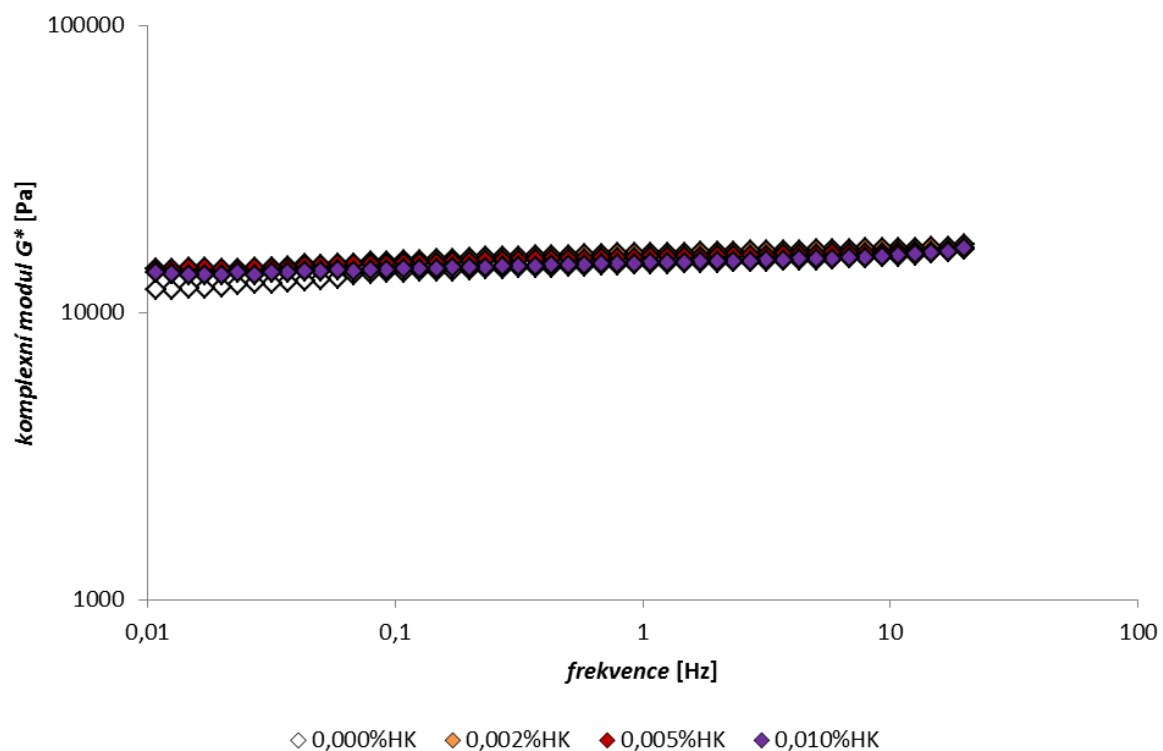
Pro přehlednost byl do grafu (Obrázek 37) vynesena jen 1 hm. % agarózový gel a pak 1 hm. % agarózové hydrogely s 0,010 hm. % přidavkem různých polyelektrolytů. Při porovnání elastického modulu G' a viskózního modulu G'' pro agarózové hydrogely s přidavky jednotlivých polyelektrolytů pozorujeme, že obměňování agarózového hydrogelu různými polyelektrolyty nemá až tak výrazný vliv na jeho finální mechanické vlastnosti, neboť nárůst/pokles hodnot není na úrovni řádu, takže ho můžeme prakticky považovat za bezvýznamný. I přesto je patrné, že AG hydrogely s přidavkem HK vykazují vyšší elasticitu gelové sítě než 1 hm. % AG hydrogely bez přidavku PE. Oproti tomu u agarózového hydrogelu s přidavkem hyaluronanu vidíme výraznější odchylku v hodnotách elastického modulu G' oproti agarózovému hydrogelu bez přidavku PE. Tento pokles svědčí o nižší elasticitě hydrogelové sítě. Můžeme tedy usuzovat, že se budou měnit i transportní a bariérové vlastnosti vlivem specifických interakcí hyaluronanu s difúzní sondou, což bude diskutováno dále.



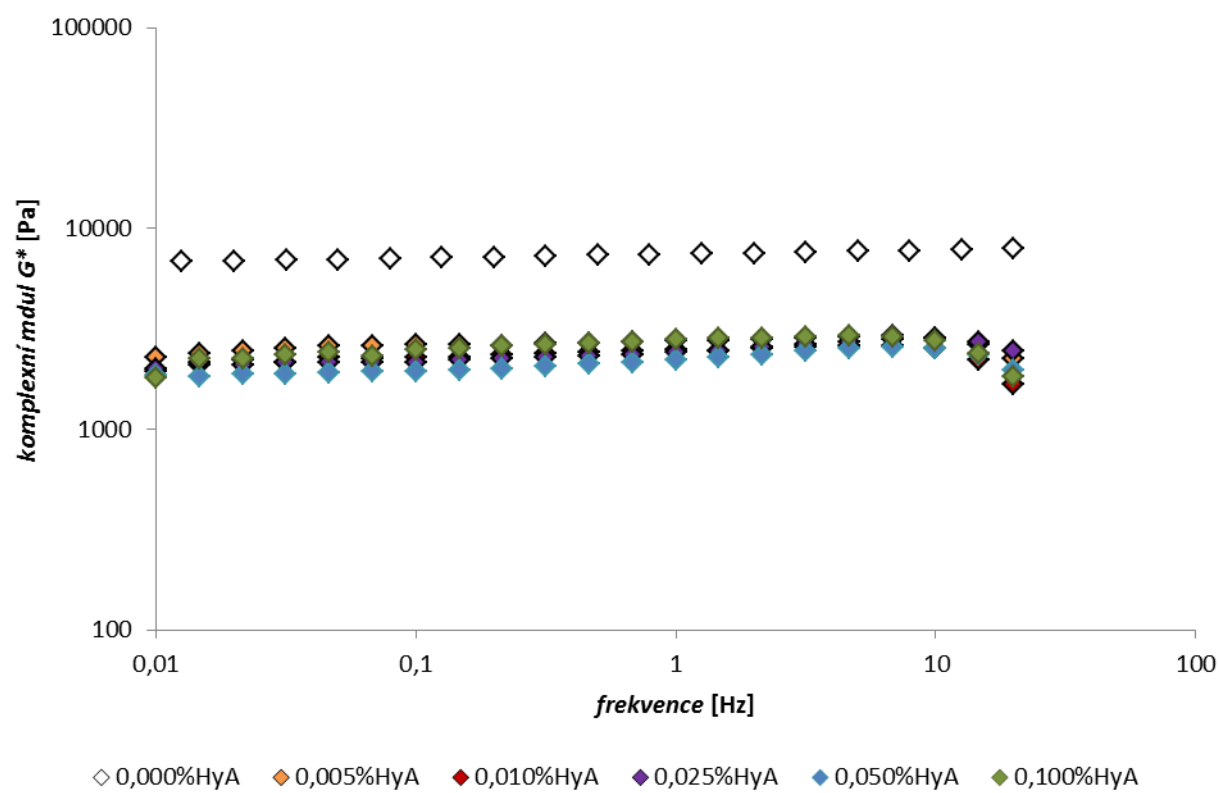
Obrázek 37: Frekvenční test s konstantní amplitudou deformace a měnící se frekvencí oscilací pro 1 hm. % AG gely s přidavkem 0,010 hm. % různých polyelektrolytů (G' – plné symboly a G'' – prázdné symboly)

V následující části je diskutován vliv koncentrace jednotlivých polyelektrolytů na výsledné viskoelastické vlastnosti agarózových hydrogelů. Pro přehlednost nebyly v následujících grafech porovnávány hodnoty jednotlivých modulů (elastický/viskózní), ale byl z nich vypočítán modul komplexní dle rovnice (16). Z grafu závislosti komplexního modulu na frekvenci oscilací pro jednotlivé polyelektrolyty (*Obrázek 38, Příloha 16, Příloha 17*) je patrné, že zvyšující se koncentrace PSS, HK a ALG v agarózovém hydrogelu nemá prakticky žádný vliv na výslednou hodnotu komplexního modulu a tím pádem na výsledné viskoelastické vlastnosti gelu. U alginátu je tento fakt o to více zajímavý, neboť koncentrace ALG dosahovala koncentrace až 0,500 hm. % v 1 hm. % AG hydrogelu.

Co se ovšem týče přidavku HyA do agarózového hydrogelu (*Obrázek 39*), byl trend zcela odlišný a to takový, že docházelo k výraznému poklesu hodnot komplexního modulu G^* oproti agarózovému hydrogelu bez přidavku HyA. Tento fakt vychází z toho, že přídavek hyaluronanu do struktury agarózového hydrogelu pravděpodobně snižuje rigiditu výsledné struktury gelu a také pevnost termoreverzibilních vazeb ve výsledném gelu. Z tohoto důvodu pravděpodobně nejsou viditelné ani žádné výraznější změny u transportních a bariérových vlastností v difúzních experimentech u AG hydrogelů s přidavkem HyA oproti AG hydrogelům bez přidavku HyA. Dalším důvodem změny viskoelastických vlastností agarózových hydrogelů s přidavkem HyA může být silná hygroskopická schopnost hyaluronanu. Přidavkem HyA do agarózového hydrogelu může docházet k určité změně gelové struktury vlivem silné interakce HyA s vodou a tím pádem i k následné změně viskoelastických vlastností.

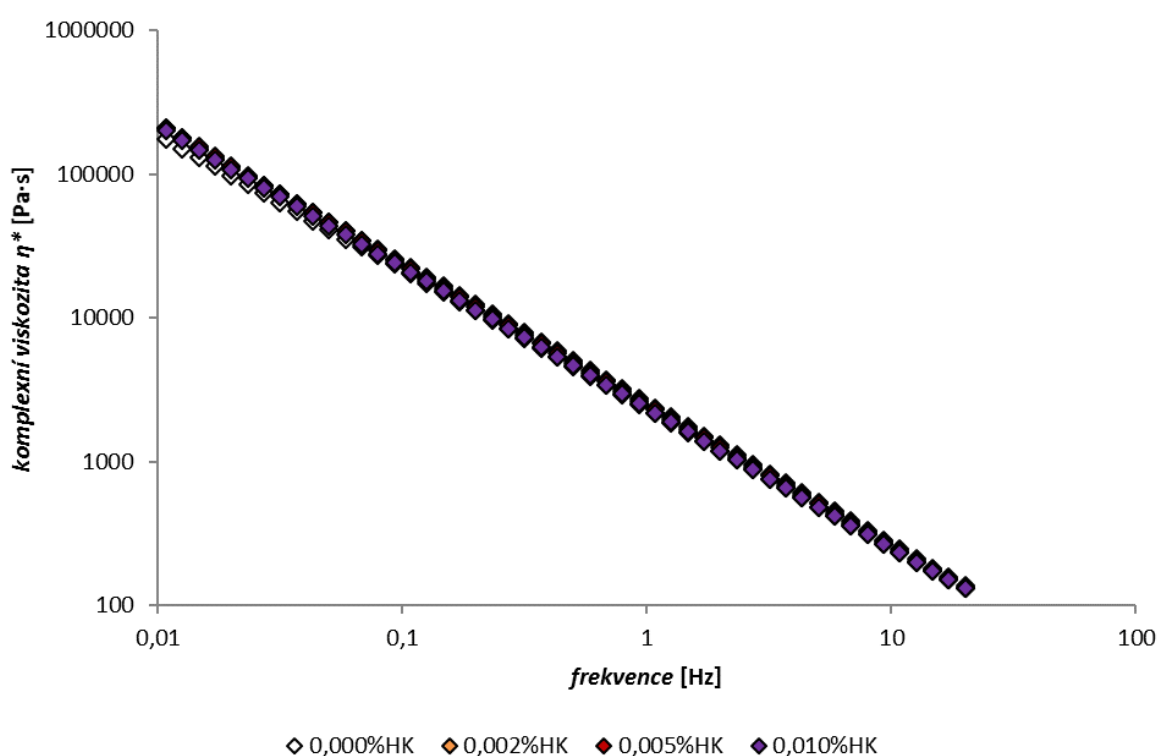


Obrázek 38: Závislost komplexního modulu G^* na frekvenci oscilace pro 1 hm. % agarózové gely s různými přídávky huminových kyselin

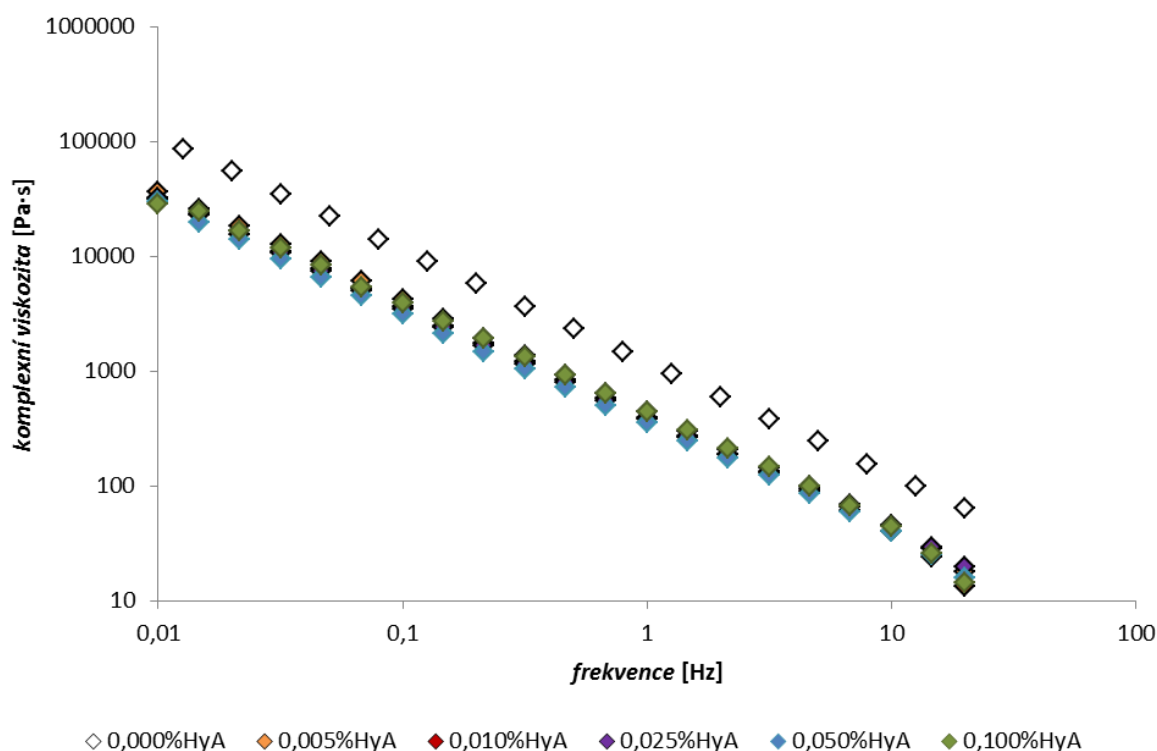


Obrázek 39: Závislost komplexního modulu G^* na frekvenci oscilace pro 1 hm. % agarózové gely s různými přídávky hyaluronanu

Na následujících grafech jsou znázorněny závislosti komplexní viskozity η^* na frekvenci oscilací u agarózových hydrogelů s přidavkem vybraných polyelektrolytů. Z grafů (Obrázek 40, Příloha 18, Příloha 19) je patrné, že hodnota komplexní viskozity vykazuje opravdu vysoké hodnoty i přes vysoký obsah vody. Pro gely je také typický lineární pokles hodnoty komplexní viskozity se zvyšující se frekvencí oscilací. Můžeme pozorovat, že dochází prakticky k totožnému způsobu síťování, neboť nedochází ke změně hodnot komplexní viskozity s rostoucí koncentrací PE v AG gelu. Zmíněné závislosti tedy prakticky potvrzují domněnku z předchozích grafů a to, že přidavek PSS, HK a ALG nemá vliv na změnu viskoelastických vlastností připravených gelů. Ovšem u přidavku HyA do agarózového hydrogelu (Obrázek 41) je z grafu opět patrný pokles hodnot komplexní viskozity. Můžeme tedy konstatovat, že přidavek hyaluronanu do agarózového hydrogelu snižuje rigiditu a tím pádem mění (zhoršuje) výsledné mechanické vlastnosti hydrogelu, což bylo již diskutováno výše.



Obrázek 40: Závislost komplexní viskozity η^* na frekvenci oscilace pro 1 hm. % agarózové gely s různými přidavky huminových kyselin



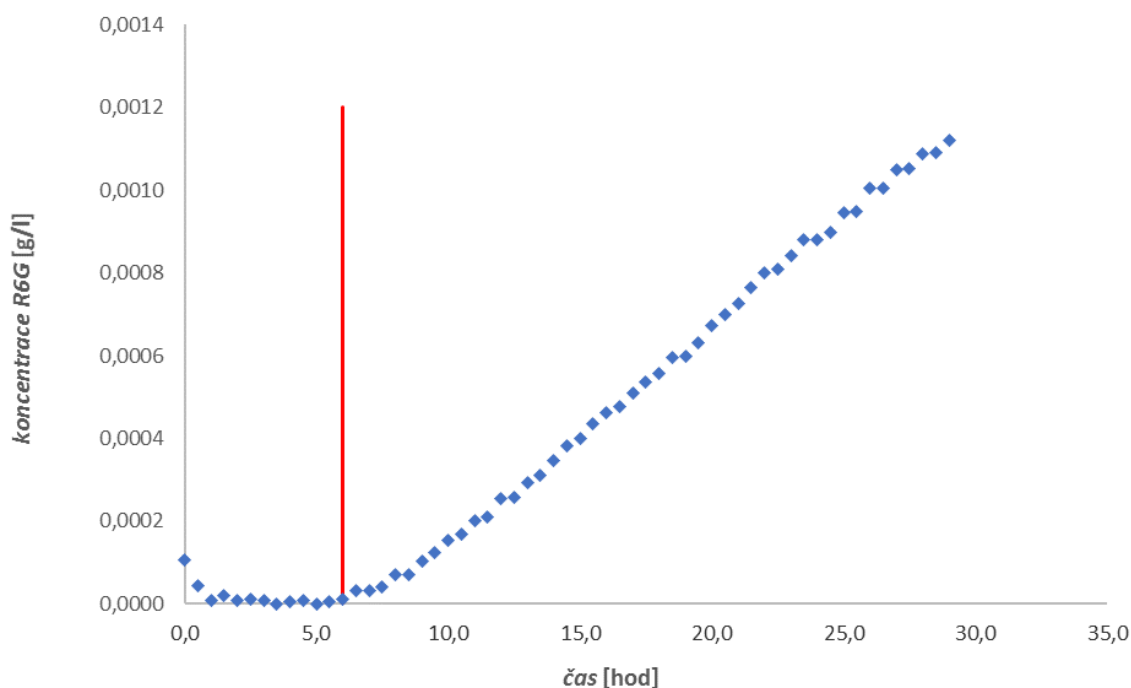
Obrázek 41: Závislost komplexní viskozity η^* na frekvenci oscilace pro 1 hm. % agarózové gely s různými přídávky hyaluronanu

Jednoduché frekvenční testy sloužily k charakterizaci výsledných agarózových gelů bez a s přidavkem vybraných polyelektrolytů. Pro shrnutí tedy můžeme říci, že zabudování PSS, HK a ALG a HyA do struktury 1 hm. % agarózových hydrogelů nemá prakticky žádný vliv na jejich výsledné viskoelastické vlastnosti, kromě zabudování HyA do gelové struktury. Je tedy pravděpodobné, že viskoelastické vlastnosti jsou závislé pouze na koncentraci samotné agarózy v gelu, a ne přímo na volbě polyelektrolytu. U agarózových hydrogelů s přidavkem hyaluronanu naopak docházelo ke snižování rigidity výsledných hydrogelů a tím pádem i ke změně jejich viskoelastických vlastností. Z výše uvedených frekvenčních testů s konstantní amplitudou deformace a měnící se frekvencí oscilací je patrné, že všechny zkoumané hydrogely mají plně zesíťovanou gelovou strukturu a vykazují viskoelastické chování s převahou elasticity v celém proměřovaném rozsahu.

6.2 Difúzní experimenty

Difúzní experimenty v hydrogelových maticích na bázi agarózy byly hlavní náplní této diplomové práce. U agarózy bylo předpokládáno, že nedochází k žádným interakcím mezi hydrogelovou maticí (agarózou) a zvolenou difúzní sondou (R6G). Pomocí experimentů ustálené difúze v horizontální difúzní cele byly studovány bariérové a transportní vlastnosti vybraných polyelektrolytů. Metoda difúzní cely je poměrně jednoduchá a levná, avšak nevhodná, pokud máme omezené množství vzorku, neboť pro metodu difúzní cely je potřeba větší množství vzorku (60 ml). Pomocí metody difúzní cely lze poměrně jednoduše studovat vliv základních fyzikálně-chemických parametrů (např. pH, iontové síly, teploty, modifikace materiálu, aj.) na transportní a bariérové vlastnosti vybraných polyelektrolytů. Předpokladem pro difúzní experiment je fakt, že nejprve bude po určitý čas probíhat sorpce barviva do gelu a následně, jakmile budou vyčerpána všechna vazebná místa ve struktuře polyelektrolytu,

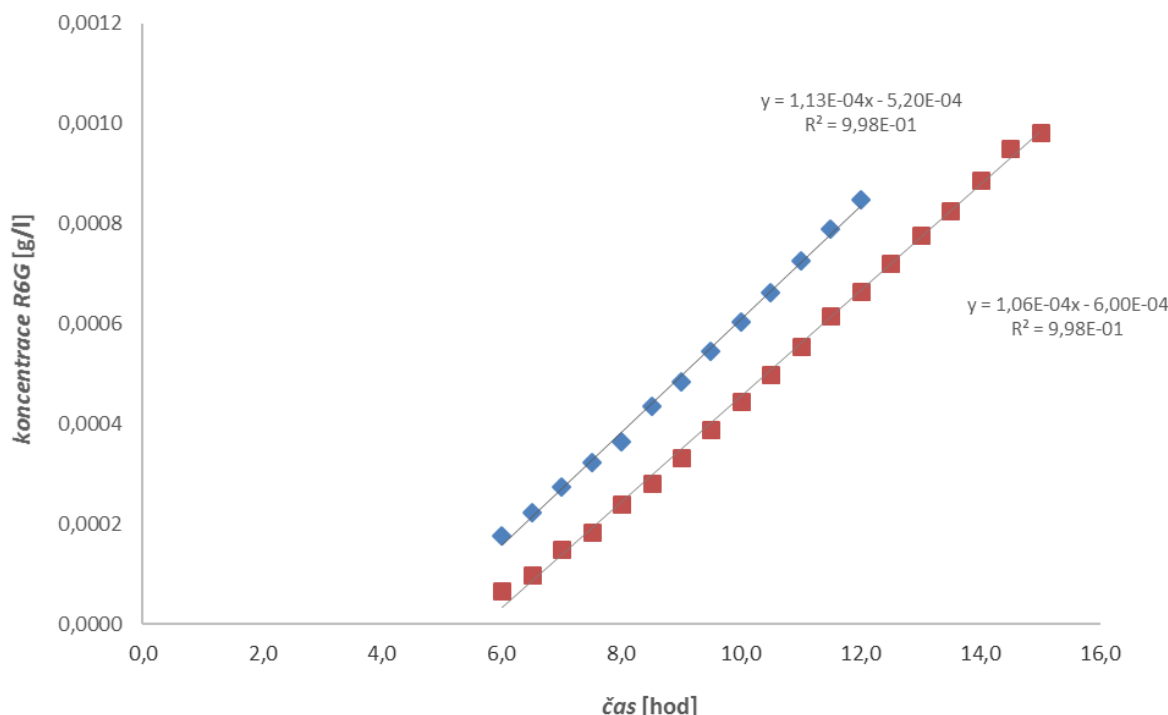
začne docházet k lineárnímu nárůstu koncentrace difúzní sondy, tzv. ustálené difúze. Při difúzních experimentech je sledována právě změna této „stacionární“ fáze, která se bude s různým přídávkem PE měnit. Na začátku je tedy koncentrace difúzní sondy v přijímací cele nulová a po určitém čase, kterému se říká čas průchodu, začne koncentrace lineárně narůstat, jak je patrné z grafu (Obrázek 42).



Obrázek 42: Závislost koncentrace difúzní sondy v přijímací difúzní cele na čase pro 1 hm. % agarózový gel s přídávkem 0,002 hm. % HK (červená čára označuje čas, od kterého probíhá ustálená difúze)

6.2.1 Stanovení fundamentálních difúzních parametrů v agarózových hydrogelech metodou difúzní cely

Hlavním cílem tohoto experimentu bylo sledování vlivu přídávku polyelektrolytu do agarózových hydrogelů na hodnoty fundamentálních difúzních parametrů zvolené difúzní sondy (efektivní difúzní koeficient, čas průchodu, nasorbované množství barviva v gelu po ukončení experimentu). Nejprve však musely být provedeny experimenty bez přídávku polyelektrolytu, tedy experimenty v čistém 1 hm. % agarózovém gelu, který zde sloužil jako hydrogelová matrice pro realizaci transportních experimentů v porézním médiu. Z grafu (Obrázek 43) je patrné, že všechny experimenty byly provedeny alespoň dvakrát, a to z důvodu, aby bylo možné určit hodnotu směrodatné odchylky. Lineární části grafů pak byly proloženy přímkami a tato směrnice nárůstu nám udává hodnotu dc/dt , která představuje závislost koncentrace difúzního barviva v přijímací cele na čase. Z této a dalších naměřených hodnot pak byly vypočítány hodnoty dalších fundamentálních difúzních parametrů, které jsou shrnuty v tabulkách níže. Na níže uvedeném grafu je pak znázorněno vyhodnocení difúzních experimentů.



Obrázek 43: Závislost koncentrace difúzní sondy v přijímací cele na čase pro 1 hm. % agarózový gel bez přídavku polyelektrolytu

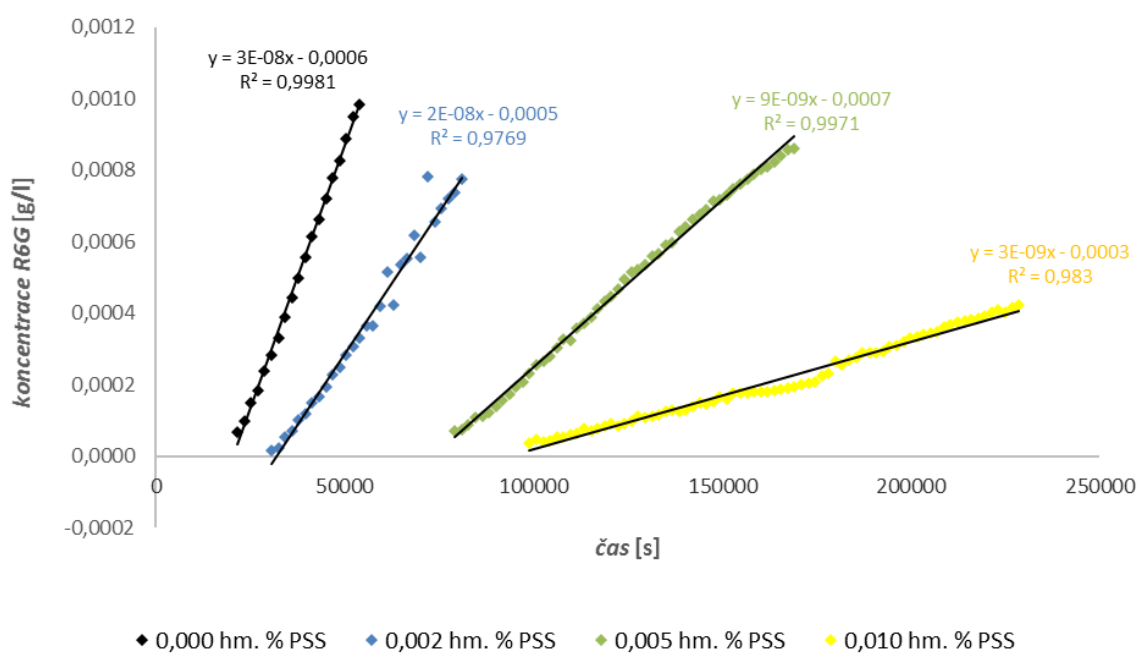
Tabulka 4: Hodnoty fundamentálních difúzních parametrů pro 1 hm. % agarózové hydrogely bez přídavku polyelektrolytu

	D_{eff} [$\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	t_p [hod]	n_{R6G} [$\times 10^{-7} \text{ mol}$]
1 hm. % AG	$7,74 \pm 0,37$	$5,1 \pm 0,8$	$3,73 \pm 0,32$

6.2.2 Vliv přídavku polyelektrolytu do agarózového hydrogelu na transportní a bariérové vlastnosti

Následující experimenty navazují na předchozí kapitolu 6.2.1 a jejím cílem bylo porovnání vlivu koncentrace jednotlivých polyelektrolytů na rychlost difúze barviva R6G skrz 1 hm. % agarózový gel s přídavkem polyelektrolytu. Naměřená data a vypočítané hodnoty jednotlivých fundamentálních difúzních parametrů pro jednotlivé vzorky jsou znázorněny a diskutovány v následujících tabulkách a grafech. Můžeme sledovat, zda přídavek PE zapříčiňuje interakce mezi difúzní sondou a polyelektrolytem. Právě tyto interakce mají zásadní vliv na rychlost difúze, a tedy i hodnoty efektivních difúzních koeficientů pro jednotlivé vzorky. Hodnoty D_{eff} pak můžeme vzájemně porovnávat a sledovat vliv přídavku polyelektrolytu do agarózových hydrogelů na transportní a bariérové vlastnosti.

Na grafu (Obrázek 44) je znázorněna závislost změny koncentrace R6G v závislosti na čase pro agarózové gely s různým přídavkem PSS. Z grafu je patrné, že přídavek PSS do gelu výrazně ovlivňuje jeho transportní vlastnosti. V přílohách dále pak můžeme vidět tytéž závislosti pro agarózové gely s různým přídavkem alginátu (Příloha 7), hyaluronanu (Příloha 8) a huminových kyselin (Příloha 9), výsledky z měření pro jednotlivé PE budou diskutovány dále.



Obrázek 44: Změna koncentrace RG6 v čase u 1 hm. % agarózových gelů s různými přídávky PSS

Pro výpočet všech výše zmíněných fundamentálních difúzních parametrů bylo nutné zaznamenat výchozí parametry pro difúzní parametry. Ty jsou zaznamenány v tabulce níže (*Tabulka 5*).

Tabulka 5: Výchozí parametry pro difúzní experimenty

výchozí parametr	hodnota
tloušťka gelu [m]	0,00557
poloměr otvoru [m]	0,01999
plocha pro difúzi [m ²]	0,00126
objem roztoků [m ³]	0,00006
molární hmotnost R6G [g·mol ⁻¹]	479,01

Všechny vypočtené hodnoty fundamentálních difúzních parametrů jsou přehledně sepsány v níže uvedených tabulkách a vyneseny do níže uvedených grafů v závislosti na koncentraci přidaného polyelektrolytu do 1 hm. % agarózového hydrogelu.

Polystyrensulfonát

Jediným zástupcem syntetických polymerů byl polystyrensulfonát sodný. PSS obsahuje ve své struktuře sulfonové skupiny, které jsou blízko u sebe. Tyto sulfonové skupiny jsou schopny disociovat a proto očekáváme, že PSS bude mít vysokou afinitu k použitému kationaktivnímu organickému barvivu R6G.

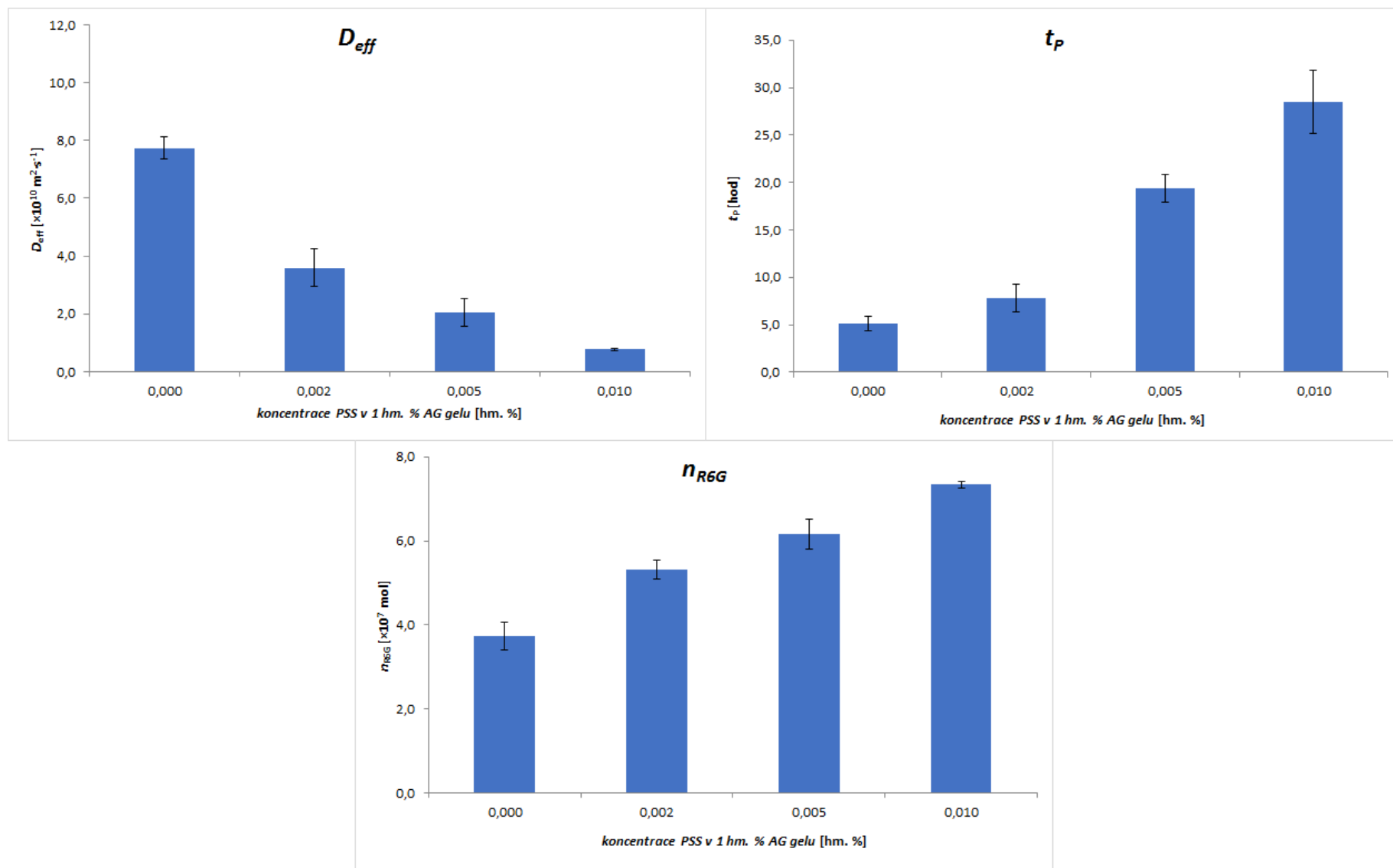
Tabulka 6: Hodnoty fundamentálních difúzních parametrů pro 1 hm. % agarózové hydrogely s přidavkem polystyrensulfonátu

přídavek PSS [hm. %] do 1 hm. % AG gelu	D_{eff} [$\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	t_p [hod]	n_{R6G} [$\times 10^{-7} \text{ mol}$]
0,000	7,74±0,37	5,1±0,8	3,73±0,32
0,002	3,60±0,64	7,8±1,4	5,32±0,22
0,005	2,05±0,48	19,4±1,4	6,16±0,35
0,010	0,76±0,02	28,5±3,3	7,34±0,08

Pzn.: pro přehlednost jsou hodnoty fundamentálních difúzních parametrů v závislosti na přidavku polystyrensulfonátu do 1 hm. % agarózového hydrogelu vyneseny do grafu níže (Obrázek 45).

Z výše uvedené tabulky je patrné, že přídavek polystyrensulfonátu do 1 hm. % agarózových hydrogelů má zásadní vliv na hodnoty fundamentálních difúzních parametrů. Se zvyšující se koncentrací této látky docházelo k poklesu hodnoty efektivního difúzního koeficientu. Pokles hodnoty D_{eff} je způsoben silnou interakcí polystyrensulfonátu s kationaktivní difúzní sondou (R6G), jelikož PSS ve své struktuře obsahují kyselé funkční skupiny, které jsou schopny disociovat a silně interagovat s kladně nabitou molekulou rhodaminu 6G. Tím pádem je celý proces difúze zpomalen přímo úměrně se zvyšující se koncentrací přídavku PE do gelu, což je patrné ze zvyšující se hodnoty času průchodu.

Pokud se v tabulce zaměříme na množství nasorbovaného barviva v hydrogelu po ukončení experimentu, je patrné, že opravdu dochází k interakcím mezi PSS a R6G, neboť toto množství narůstá se zvyšující se koncentrací PSS v AG gelu. Pokud se podíváme na čisté 1 hm. % agarózové hydrogely, je množství nasorbovaného barviva téměř 2x nižší než v případě 1 hm. % AG hydrogelů s přidavkem 0,010 hm. % PSS. Tento jev je způsoben vysokou nábojovou hustotou molekuly polystyrensulfonátu oproti ostatním použitým polyelektrolytům, neboť změny ve viskoelastických vlastnostech se zvyšující se koncentrací PSS v AG gelu nenastávají.



Obrázek 45: Závislosti fundamentálních difúzních parametrů na proměnlivé koncentraci polystyrensulfony v 1 hm.% agarózovém gelu

Huminové kyseliny

Prvním zástupcem přírodních polymerů byly lignitické huminové kyseliny izolované z jihomoravského lignitu. Afinita huminových kyselin k opačně nabitým sloučeninám (polutanty, ionty těžkých kovů, aj.), která již byla popisována v kapitole 3.3, je způsobena vysokým množstvím funkčních skupin ve struktuře HK, které mají převážně kyselý charakter (karboxylové, hydroxylové, methoxylové, ketoskupiny).

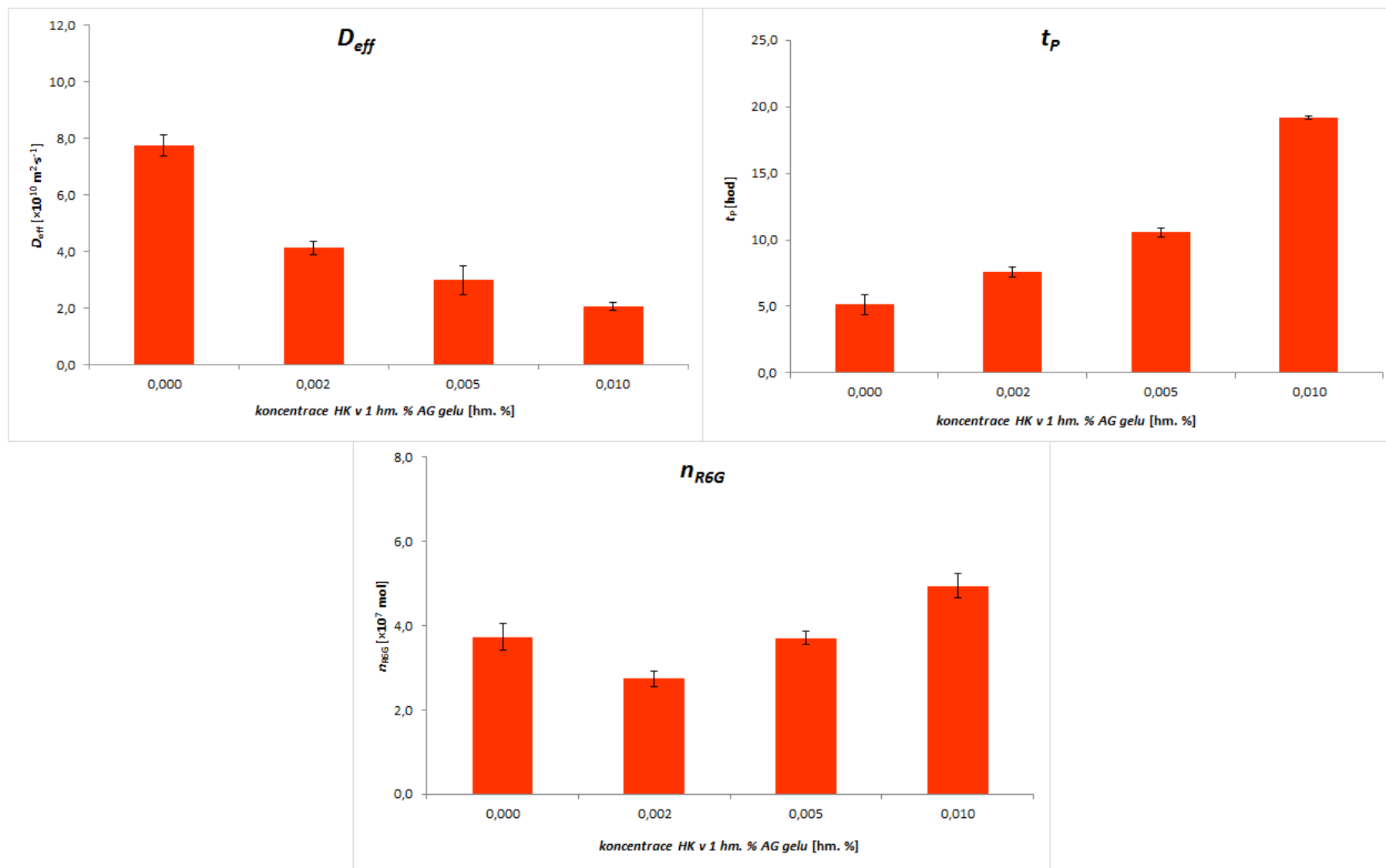
Tabulka 7: Hodnoty fundamentálních difúzních parametrů pro 1 hm. % agarózové hydrogely s přidavkem huminových kyselin

<i>přídavek HK [hm. %] do 1 hm. % AG gelu</i>	<i>D_{eff} [$\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]</i>	<i>t_p [hod]</i>	<i>n_{R6G} [$\times 10^{-7} \text{ mol}$]</i>
0,000	7,74±0,37	5,1±0,8	3,73±0,32
0,002	4,13±0,23	7,6±0,4	2,74±0,19
0,005	2,99±0,51	10,6±0,3	3,71±0,16
0,010	2,07±0,13	19,2±0,1	4,95±0,29

Pzn.: pro přehlednost jsou hodnoty fundamentálních difúzních parametrů v závislosti na přídavku huminových kyselin do 1 hm. % agarózového hydrogelu vyneseny do grafu níže (Obrázek 46).

I pro huminové kyseliny je z tabulky i grafu (Tabulka 7, Obrázek 46) viditelné, že dochází k výraznému nárůstu času průchodu, kdy čas průchodu roste se zvyšující se koncentrací HK v 1 hm. % AG gelu. Změna v difuzivitě organického barviva není ani v tomto případě způsobena změnou mechanických vlastností agarózových hydrogelů s přidavkem HK, neboť u nich nedochází ke změně mechanických vlastností. Tento fakt byl ověřen pomocí reologických měření a diskutován v kapitole 6.1.2. Změna sledovaných fundamentálních difúzních parametrů je tedy i v tomto případě způsobena specifickou interakcí mezi celkově záporně nabitými huminovými kyselinami a kladně nabitou difúzní sondou (R6G), jelikož opět dochází k disociaci a silné interakci mezi polyelektrolytem a difúzní sondou. Tím pádem je celý proces difúze opět zpomalen přímo úměrně se zvyšující se koncentrací přídavku polyelektrolytu do agarózového gelu.

Při pohledu na hodnoty a graf nasorbovaného množství barviva v gelu po ukončení experimentu je patrné, že HK opravdu interagují s procházejícím barvivem, neboť se množství tohoto barviva v gelu se zvyšující se koncentrací huminových kyselin v agarózovém hydrogelu opět zvyšuje. Míra reaktivity huminových kyselin je o něco nižší než u polystyrensulfonátu, což je způsobeno nábojovou hustotou, neboť oproti PSS mají HK o něco nižší nábojovou hustotu, a proto není interakce s kationaktivním barvivem tak výrazná jako v případě PSS, jak je viditelné z grafu nasorbovaného množství barviva v gelu po ukončení experimentu. Můžeme tedy tvrdit, že funkční skupiny kyselého charakteru zpomalují sorpci difúzní sondy do hydrogelové struktury, a to díky vzájemné interakci.



Obrázek 46: Závislosti fundamentálních difúzních parametrů na proměnlivé koncentraci huminových kyselin v 1 hm.% agarózovém gelu

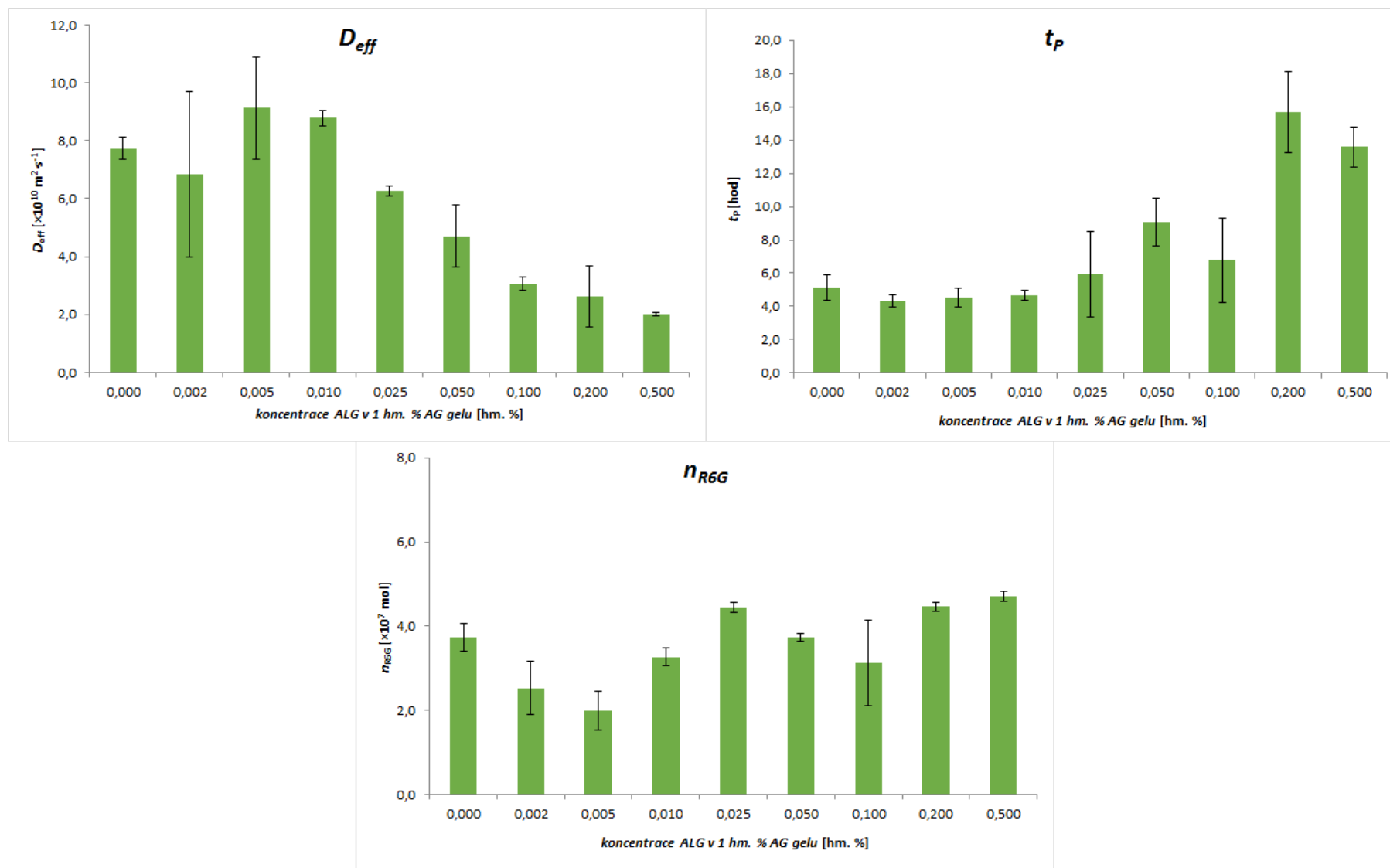
Alginát

Dalším zvoleným polyelektrolytem pro studium transportních a bariérových vlastností byl přírodní lineární polysacharid alginát sodný. Na rozdíl od výše zmíněných huminových kyselin nevyvolával přidavek ALG do struktury agarózových hydrogelů žádné výraznější změny při nižších koncentracích ALG v hydrogelu. Pro 1 hm. % agarózové hydrogely s přidavkem alginátu vidíme, že pro nižší koncentrace ALG v AG gelu nevykazují hodnoty efektivního difúzního koeficientu signifikantní rozdíly. Rozdíly v hodnotách fundamentálních difúzních parametrů při nižších koncentracích ALG v AG gelu jsou na úrovni chybových úseček, takže tyto hodnoty můžeme považovat za téměř totožné. K poklesu efektivního difúzního koeficientu a nárůstu času průchodu dochází až při vyšších koncentracích ALG v AG gelu (přibližně až od přidavku 0,025 hm. % ALG v 1 hm. % AG gelu), což může být způsobeno poměrně vysokou nábojovou hustotou ALG, jeho vzájemnou interakcí s difúzní sondou, případně změnou mechanických vlastností výsledného hydrogelu. Jak již bylo ověřeno reologickým měřením, ke změně mechanických vlastností výsledného hydrogelu nedochází, takže musí docházet k výše zmiňovaným interakcím. Tuto domněnku potvrzuje klesající efektivní difúzní koeficient a narůstající čas průchodu u vyšších koncentrací, avšak je patrné, že dochází pouze k velmi mírnému nárůstu hodnot nasorbovaného barviva do struktury agarózového hydrogelu po ukončení experimentu. Tím pádem můžeme říci, že k interakcím ALG a R6G u vyšších koncentrací dochází, avšak ne k tak silným jako v případě přidavku HK a PSS do AG hydrogelu.

Tabulka 8: Hodnoty fundamentálních difúzních parametrů pro 1 hm. % agarózové hydrogely s přidavkem alginátu

přídavek ALG [hm. %] do 1 hm. % AG gelu	D_{eff} [$\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	t_p [hod]	n_{R6G} [$\times 10^{-7} \text{ mol}$]
0,000	7,74±0,37	5,1±0,8	3,73±0,32
0,002	6,85±2,85	4,3±0,4	2,53±0,62
0,005	9,13±1,77	4,5±0,6	1,99±0,46
0,010	8,79±0,27	4,6±0,3	3,27±0,21
0,025	6,27±0,18	5,9±2,6	4,45±0,11
0,050	4,71±1,08	9,1±1,4	3,73±0,10
0,100	3,06±0,23	6,8±2,5	3,14±1,01
0,200	2,63±1,05	15,7±2,4	4,46±0,11
0,500	2,01±0,07	13,6±1,2	4,72±0,12

Pzn.: pro přehlednost jsou hodnoty fundamentálních difúzních parametrů v závislosti na přidavku alginátu do 1 hm. % agarózového hydrogelu vyneseny do grafu níže (Obrázek 47).



Obrázek 47: Závislosti fundamentálních difúzních parametrů na proměnlivé koncentraci alginátu v 1 hm.% agarózovém gelu

Hyaluronan

Poslední zvoleným biopolymerem pro studium transportních a bariérových vlastností metodou difúzní cely byl hyaluronan sodný. Hyaluronan je obecně známý svou silnou hygroskopickou schopností, kdy tento fakt může mít zcela zásadní vliv na jeho transportní a bariérové vlastnosti v hydrogelovém systému.

Tabulka 9: Hodnoty fundamentálních difúzních parametrů pro 1 hm. % agarózové hydrogely s přidavkem hyaluronanu

přídavek HyA [hm. %] do 1 hm. % AG gelu	D_{eff} [$\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	t_p [hod]	n_{R6G} [$\times 10^{-7} \text{ mol}$]
0,000	7,74±0,37	5,1±0,8	3,73±0,32
0,002	9,10±2,03	4,2±0,7	3,08±0,28
0,005	6,89±0,58	5,6±1,3	2,89±0,04
0,010	8,80±1,84	4,3±1,0	3,05±0,02
0,025	8,70±2,45	4,0±0,6	2,84±0,24
0,050	6,48±0,31	6,7±0,5	2,83±0,36
0,100	6,18±0,48	6,6±0,7	3,89±0,06

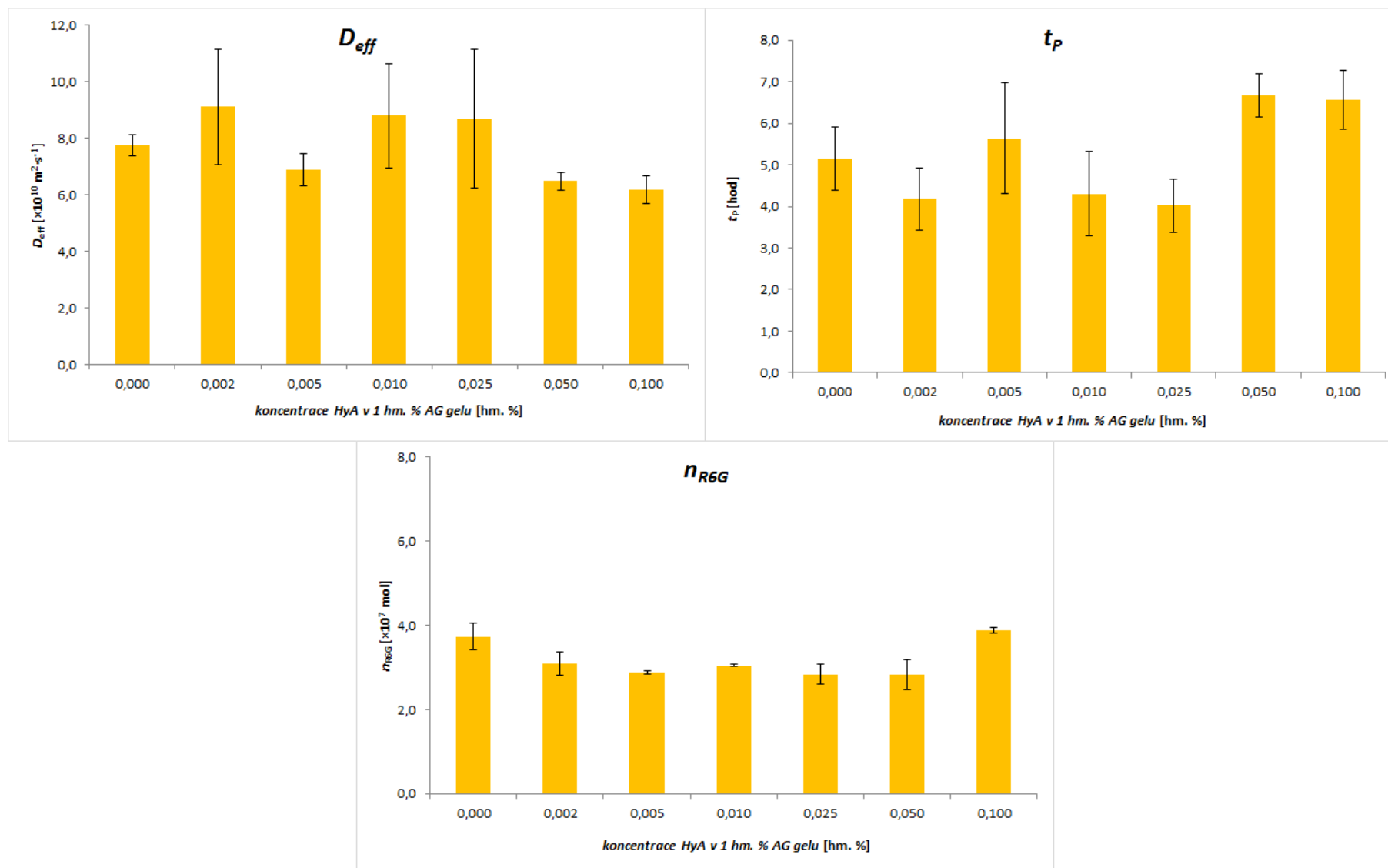
Pzn.: pro přehlednost jsou hodnoty fundamentálních difúzních parametrů v závislosti na přídavku HyA do 1 hm. % agarózového hydrogelu vyneseny do grafu níže (Obrázek 48).

Byl očekáván obdobný trend jako u PSS a HK a to, že rostoucí koncentrace HyA v AG hydrogelech bude snižovat hodnoty efektivních difúzních koeficientů vlivem interakcí HyA a barviva R6G. Z naměřených výsledků je však patrné, že u agarózových hydrogelů s přidavkem hyaluronanu, nedochází prakticky k vůbec žádné interakci mezi HyA a R6G. Hodnoty efektivních difúzních koeficientů, časů průchodu ani nasorbované množství barviva v gelu po ukončení experimentu se v celém proměřovaném rozsahu koncentrací prakticky nijak výrazně nemění, což může být způsobeno hned několika charakteristickými vlastnostmi hyaluronanu. Oproti ostatním zvoleným polyelektrolytům má nižší hustotu náboje ve své struktuře, tedy i nižší počet hypotetických vazebných míst, kam může být difúzní sonda navázána. Tento fakt musí mít jednoznačný vliv na míru interakce mezi HyA a R6G.

Dále může být „neinterakce“ mezi HyA a R6G způsobena právě schopností hyaluronanu vázat obrovské množství vody do své struktury. Vzhledem k tomu, že připravované agarózové hydrogely jsou z více než 98 % tvořeny vodou, dochází pravděpodobně k hydrataci postranních řetězců HyA, kdy voda začne tvořit ve struktuře jakousi bariéru pro interakci s difúzní sondou, neboť i z grafu nasorbovaného množství difúzní sondy do struktury gelu po ukončení experimentu je patrné, že nedocházelo k zakonzervování barviva do struktury hydrogelu.

Dalším důvodem může být pokles rigidity a pevnosti termoreverzibilních vazeb hydrogelové sítě přidavkem HyA do AG gelu. Jak již bylo ověřeno reologickým měřením, přidavek HyA do AG gelu má výrazný vliv na mechanické vlastnosti gelu. Neboť však nesledujeme prakticky žádný výraznější vliv přídavku různě koncentrovaného hyaluronanu do agarózového hydrogelu na hodnoty difúzních parametrů, tato domněnka asi nebude správná. Výraznější změny v hodnotách fundamentálních difúzních parametrů jsou na úrovni chybových úseček, takže je můžeme považovat za irelevantní.

Na základě této diskuse můžeme usuzovat, že hyaluronan jako jeden ze zvolených biopolymerů nemá tak dobré transportní a bariérové vlastnosti jako je tomu třeba u přírodních huminových kyselin, nebo syntetického polystyrensulfonátu.



Obrázek 48: Závislosti fundamentálních difúzních parametrů na proměnlivé koncentraci hyaluronanu v 1 hm.% agarózovém gelu

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřená na studium bariérových a transportních vlastností vybraných polyelektrolytů v hydrogelových maticích pomocí difúzních technik. Nejprve bylo nutné pomocí reologického měření charakterizovat viskoelastické chování agarózových hydrogelů s a bez přídavku vybraných polyelektrolytů. Z naměřených dat je zřejmé, že všechny připravené hydrogely disponují plně síťovanou gelovou strukturou, což je patrné z hodnot elastického modulu G' , který v celém měřeném rozsahu převyšuje hodnoty modulu viskózního G'' . Přídavek PSS, HK a ALG do agarózového hydrogelu nemá prakticky žádný vliv na hodnotu komplexního modulu G^* ani komplexní viskozity η^* (tyto hodnoty byly použity pro vyvození závěrů o viskoelastickém chování agarózových hydrogelů). Z vyhodnocení je patrné, že přídavkem těchto polyelektrolytů se nemění mechanické vlastnosti výsledných agarózových hydrogelů. Ovšem přídavek HyA do agarózového hydrogelu měl za následek pokles hodnoty komplexního modulu G^* a také komplexní viskozity η^* oproti agarózovému hydrogelu bez přídavku HyA. To bylo pravděpodobně způsobeno právě přídavkem HyA do AG gelu, kdy dochází ke snížení rigidity a také poklesu pevnosti termoreverzibilních vazeb výsledné struktury hydrogelu a tím pádem i ke změně mechanických vlastností.

Stěžejním bodem předložené práce byla difúze v horizontální Stokesově difúzní cele. Difúzní techniky slouží jako jednoduchý a univerzální nástroj pro studium a následnou charakterizaci různých druhů polyelektrolytů. Experimenty byly prováděny v agarózových hydrogelech, které jsou vhodnou maticí pro studium fundamentálních difúzních parametrů. Výhodou agarózových hydrogelů je, že výborně simulují přirozené podmínky výskytu vybraných biopolymerů (příroda), a to díky vysokému obsahu vody zabudovanému ve své struktuře. Další výhodou agarózových hydrogelů je, že můžeme připravit gely o přesně definovaném tvaru i velikosti, dále také o námi zvolené velikosti pórů, aj. Výstupem z tohoto měření byly hodnoty fundamentálních difúzních parametrů (*efektivní difúzní koeficient, čas průchodu a nasorbované množství barviva v hydrogelu po ukončení experimentu*) a jejich porovnání v závislosti na koncentraci a typu polyelektrolytu přidaného do agarózového hydrogelu. Pokud bychom chtěli shrnout výsledky difúzních experimentů, jednoznačně nemůžeme říci, že přídavek buď přírodních, nebo syntetických polymerů do struktury agarózového gelu ovlivňuje difúzní experimenty více či méně. Obecně můžeme konstatovat, že syntetický PSS a přírodní HK vykazovaly vysokou afinitu ke zvolenému organickému barvivu (rhodaminu 6G) a to z důvodu množství kyselých skupin ve své struktuře. Tím pádem docházelo k interakcím s difúzní sondou a následkem toho ke zvýšení hodnot času průchodu. Oproti tomu přírodní alginát zabudovaný do struktury AG gelu nevykazoval u nižších koncentrací moc velké rozdíly hodnot efektivních difúzních koeficientů. Změny v chování vykazoval až od vyšších koncentrací (od koncentrace 1 hm. % AG + 0,025 hm. % ALG). K poklesu hodnot D_{eff} docházelo až u vyšších koncentrací ALG, což je pravděpodobně způsobeno interakcí s difúzní sondou, neboť ke změně viskoelastických vlastností gelu nedochází, jak je patrné z výsledků reologických měření. Další přírodní polysacharid, který byl zvolen jako zástupce pro difúzní experimenty, byl hyaluronan, který vykazoval opět odlišné chování oproti výše jmenovaným polyelektrolytům. Přídavek hyaluronanu do 1 hm. % agarózového hydrogelu neměl prakticky žádný vliv na hodnoty fundamentálních difúzních parametrů, což bylo pravděpodobně způsobeno poklesem rigidity výsledné gelové struktury a také tím, že nedocházelo k žádným interakcím s použitým organickým barvivem v celém proměřovaném rozsahu.

Závěrem můžeme konstatovat, že difúzní experimenty v horizontální difúzní cele jsou vhodné a univerzální pro studium transportních a bariérových vlastností jak syntetických, tak přírodních látek a podávají reprezentativní výsledky o chování vybraných polyelektrolytů v hydrogelových maticích. Problematiku studia difúzí pomocí difúzní cely je možné jednoduše obměňovat změnou teploty, změnou pH, změnou difúzní sondy, změnou zvolených polyelektrolytů atd.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] INCAN nutrition s.r.o. *Incan: Huminové látky* [online]. 2012. Dostupné z: <http://www.incan.cz/index.php/huminove-latky>
- [2] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, **99** (10), 711–717. ISSN 1213-7103.
- [3] SUTTON, Rebecca a Garrison SPOSITO. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science and Technology*. 2005, **39**(23), 9009-9015. DOI: 10.1021/es050778q. ISSN 0013-936x.
- [4] HRDÝ, Michal. Organické složky zemin: Frakcionace přirozených organických látek v zeminách. *Dekontaminační technologie* [online]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/uchop/CDmartin/4-dekontaminovana/1-2.html>
- [5] WEBER, Jerzy. Definition of soil organic matter. In: *Humintech: Humic acids based products* [online]. Dostupné z: http://admin.abssa.com.mx/uploads/misc/DEFINITION_OF_SOIL_ORGANIC_MATTER.pdf
- [6] STEINBÜCHEL, Alexander a Martin HOFRIECHTER. *Biopolymers: Lignin, Humic substances and Coal*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. ISBN 978-352-7302-901.
- [7] KUČERÍK, Jiří. *Study on lignite humic acids: Studium lignitických huminových kyselin: zkrácená verze Ph. D. Thesis*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2004. Vědecké spisy Vysokého učení technického v Brně. ISBN 80-214-2596-2.
- [8] STEVENSON, F.J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley, 1994, 496 s. ISBN 0471594741.
- [9] ŽÁČEK, Ladislav. *Hydrochemie: Organické látky ve vodách*. Vyd. 1. Brno: VUTIU, 1998. ISBN 80-214-1167-8.
- [10] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Původ a struktúra. *Chemické listy*. 2008, **102**(4), 262-268. ISSN 1213-7103.
- [11] MIKULÁŠKOVÁ, Barbora, Lubomír LAPČÍK a Ivan MAŠEK. Lignit - struktura, vlastnosti a použití. *Chemické listy*. 1997, **91**(3), 160-168. ISSN 1213-7103.
- [12] KICKUTH, R., SCHEFFER, F.: Constitutive and nutritive properties of the so-called pseudo-amide nitrogen from humic acids. *Agrochimica*, 1976, **20**(4-5), 373-386.
- [13] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Interakcie humínových kyselin s kontaminantami. *Chemicke Listy*. 2008, **102**(5), 338-345. ISSN 1213-7103.
- [14] VRBA, Vladimír a Ludvík HULEŠ. Humus - půda - rostlina (2) Humus a půda. *Biom.cz* [online]. ISSN 1801–2655. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-2-humus-a-puda>
- [15] PHILLIPS, G. O. a P. A. WILLIAMS. *Handbook of Hydrocolloids (2nd Edition)*. 2nd ed. S.I.: Woodhead Publishing, 2009. ISBN 978-184-5694-142.
- [16] Alginate. *Water Structure and Science* [online]. 2002. Dostupné z: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/alginate.html>

- [17] SMILEK, Jiří. *Nové metody studia reaktivity biokoloidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 166 s. (přílohy 65 s.). Vedoucí dizertační práce: prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [18] BRUCHET, Marion a Artem MELMAN. Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. *Carbohydrate Polymers*. 2015, **131**, 57-64. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.05.021. ISSN 01448617.
- [19] LIU, Jun, Stefan WILLFÖR a Chunlin XU. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2015, **5**(1), 31-61. DOI: 10.1016/j.bcdf.2014.12.001. ISSN 2212-6198.
- [20] LUO, Yangchao a Qin WANG. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **64**, 353-367. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017. ISSN 01418130.
- [21] RHIM, Jong-Whan. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT - Food Science and Technology*. 2004, **37**(3), 323-330. DOI: 10.1016/j.lwt.2003.09.008. ISSN 00236438.
- [22] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [23] ŠOSTAR TURK, Sonja a Reinhold SCHNEIDER. Printing properties of a high substituted guar gum and its mixture with alginate. *Dyes and Pigments*. 2000, **47**(3), 269-275. DOI: 10.1016/S0143-7208(00)00055-3. ISSN 01437208.
- [24] ROWLEY, Jon A., Gerard MADLAMBAYAN a David J. MOONEY. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*. 1999, **20**(1), 45-53. DOI: 10.1016/S0142-9612(98)00107-0. ISSN 01429612.
- [25] BERND H. A. REHM. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*. 2010, **8**(8), 578-592. DOI: 10.1038/nrmicro2354. ISSN 17401526.
- [26] MIKOLÁŠOVÁ, Kristýna. *Charakterizace interakcí hyaluronanu a albuminu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [27] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství: Hyaluronan - biopolymer for tissue engineering: teze habilitační práce*. Brno: VUTUM, 2012. 29 s. ISBN 978-80-214-4420-1. Teze habilitační práce. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická.
- [28] Kyselina hyaluronová. Contipro [online]. Dostupné z: <http://www.contipro.com/cs/o-kyseline-hyaluronove>
- [29] Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum* [online]. 2017. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [30] Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution: Some biological consequences. *Glycoforum* [online]. 2017. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [31] NEČAS, Jiří, L BARTOSIKOVA, P BRAUNER a J KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, **53**(8), 397-411.

- [32] Hyiodine: Hlavní složka kyselina hyaluronová. CONTIPRO PHARMA, a.s. [online]. Dostupné z: <http://www.hyiodine.cz/o-hyiodine>
- [33] HRAZDIRA, Luboš. Periartikulární injekční forma kyseliny hyaluronové. *Remedia*. 2008, **18**(5), 399-400.
- [34] Hyaluronic acid. *KaviSkin* [online]. 2013. Dostupné z: <http://www.kaviskin.com/info/hyaluronicacid.html>
- [35] LUO, Yi, Kelly R KIRKER a Glenn D PRESTWICH. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2000, **69**(1), 169-184. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00300-X.
- [36] Hyaluronan ve veterinární medicíně. *Contipro pharma, a.s.* [online]. Dostupné z: <http://www.contipro.com/cs/hyaluronan-ve-veterinarni-medicine>
- [37] STERN, R, A ASARI a K SUGAHARA. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*. 2006, **85**(8), 699-715. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009. ISSN 01719335.
- [38] PECHAR, Michal a Karel ULBRICH. Polymerní terapeutika u nás a ve světě. *Chemické listy*. 2009, **103**(1), 3-10. ISSN 1213-7103.
- [39] Polystyrene sulfonate. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Polystyrene_sulfonate
- [40] *Drugs.com : Drugs Information Online* [online]. 2000. Sodium Polystyrene Sulfonate. Dostupné z: <http://www.drugs.com/pro/sodium-polystyrene-sulfonate.html>.
- [41] ZEBROWSKI, Beth E. a Gerald G. FULLER. Rheo-optical studies of concentrated polystyrene solutions subjected to transient simple shear flow. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*. 1985, **23**(3), 575-589. DOI: 10.1002/pol.1985.180230313. ISSN 00981273.
- [42] Poly(sodium 4-styrenesulfonate). Sigma-Aldrich: chemical directory [online]. Nottingham: Hampden Data, 1997. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polysodium4styrenesulfonate>
- [43] YEAGER, H. L. Cation and Water Diffusion in Nafion Ion Exchange Membranes: Influence of Polymer Structure. *Journal of The Electrochemical Society*. 1981, **128**(9), 1880-. DOI: 10.1149/1.2127757. ISSN 00134651.
- [44] RENN, Donald W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial* [online]. 1984, **23**(1), 17-21. DOI: 10.1021/i300013a004. ISSN 0196-4321.
- [45] Agarose Selection Guide. *Sigma-Aldrich chemical directory* [online]. Nottingham: Hampden Data, 1997. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a9918?lang=en®ion=CZ>
- [46] Agarose. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Agarose>
- [47] Module 1, Day 2: Purify Aptamer-Encoding DNA. In: *Massachusetts Institute of Technology: OpenCourseWare* [online]. 2001. Dostupné z: <https://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/20-109-laboratory-fundamentals-in-biological-engineering-spring-2010/labs/module-1-day-2-purify-aptamer-encoding-dna/>

- [48] SMILEK, Jiří. *Studium reaktivity biopolymerů v gelové fázi*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 94 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [49] Agaróza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Agaróza>
- [50] OSMAN, Mohamed E., Alan R. MENZIES, Beatriz Albo MARTIN, Peter A. WILLIAMS, Glyn O. PHILLIPS a Timothy C. BALDWIN. Characterization of gum arabic fractions obtained by anion-exchange chromatography. *Phytochemistry*. 1995, **38**(2), 409-417. DOI: 10.1016/0031-9422(94)00645-A. ISSN 00319422.
- [51] STOKOLS, Shula, Jeff SAKAMOTO, Chris BRECKON, Todd HOLT, James WEISS a Mark H. TUSZYNSKI. Templated Agarose Scaffolds Support Linear Axonal Regeneration. *Tissue Engineering*. 2006, **12**(10), 2777-2787. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2777. ISSN 1076-3279.
- [52] SEDLÁČEK, Petr, Jiří SMILEK a Martina KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – Results from diffusion cells. *Reactive and Functional Polymers*. 2013, **73**(11), 1500-1509. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.008. ISSN 13815148.
- [53] PENZKOFER, Alfons a W. LEUPACHER. Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions. *Journal of Luminescence*. 1987, **37**(2), 61-72. DOI: 10.1016/0022-2313(87)90167-0. ISSN 00222313.
- [54] ZHANG, Xian-Fu, Yakui ZHANG a Limin LIU. Fluorescence lifetimes and quantum yields of ten rhodamine derivatives: Structural effect on emission mechanism in different solvents. *Journal of Luminescence*. 2014, **145**(2), 448-453. DOI: 10.1016/j.jlumin.2013.07.066. ISSN 00222313.
- [55] Rhodamine 6G. *Sigma-Aldrich Co.* [online]. Praha, 2016. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/rhodamin6g>
- [56] Rhodamine 6G. *Oregon Medical Laser Center* [online]. Oregon Health & Science University, Portland State University & Oregon Institute of Technology, 2012. Dostupné z: <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/083.html>
- [57] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [58] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [59] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Co je co v povrchové a koloidní chemii: výkladový slovník* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/
- [60] KALINA, Michal. *Využití průtokové coulometrie ve studiu transportu kovových iontů v huminových gelech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 69 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D
- [61] SEDLÁČEK, Petr. *Reologie gelů – stručný přehled*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 34 s.
- [62] VOJUCKIJ, Sergej Sergejevič. *Kurs koloidní chemie*. Praha: SNTL, 1984, 396 s.

- [63] STEFFE, James Freeman. *Rheological methods in food process engineering*. 2nd ed. East Lansing, MI: Freeman Press, 1996. ISBN 09-632-0361-4
- [64] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [65] Hydrocolloid Rheology. *Water Structure and Science* [online]. London: CC BY-NC-ND 2.0 UK, 2016. Dostupné z: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/rheology.html>
- [66] CHEN, Daniel T.N., Qi WEN, Paul A. JANMEY, John C. CROCKER a Arjun G. YODH. Rheology of Soft Materials. *Annual Review of Condensed Matter Physics*. 2010, **1**(1), 301-322. DOI: 10.1146/annurev-conmatphys-070909-104120. ISSN 1947-5454.
- [67] CHYTIL, Martin. Měření reologických vlastností hyaluronanu. *CHEMPOINT: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. 2011. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mereni-reologickych-vlastnosti-hyaluronanu>.
- [68] MEZGER, Thomas. *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. 4th edition. Hannover: Vincentz Network, 2014. European coatings tech files. ISBN 978-3-86630-842-8.
- [69] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-708-0475-0.
- [70] Heat and Mass Transfer 2 (2+0): Lesson-31: Introduction, Fick's law of Diffusion, Mass Transfer Coefficients. *E-Krishi Shiksha* [online]. 2014. Dostupné z: <http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/page/view.php?id=2367>
- [71] CRANK, John. *The mathematics of diffusion*. 2. Oxford: Oxford University Press, 1975, 414 s. ISBN 9780198534112.
- [72] Custom Cells. *PermeGear, Inc.* [online]. 2015. Dostupné z: <http://permegear.com/custom-cells/>
- [73] SEDLÁČEK, P. *Hydrogely huminových kyselin - experimentální model i aplikační forma*. Ph.D. thesis. Brno: VUT v Brně, Fakulta chemická, 2009. 139 s.
- [74] MASARO, L a X.X ZHU. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in Polymer Science*. 1999, **24**(5), 731-775. DOI: 10.1016/S0079-6700(99)00016-7. ISSN 00796700.
- [75] SEDLÁČEK, Petr, Jiří SMILEK a Martina KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – 2. Non-stationary diffusion experiments. *Reactive and Functional Polymers*. 2014, **75**(11), 41-50. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2013.12.002. ISSN 13815148.
- [76] ANIRUDHAN, T.S. a P.S. SUCHITHRA. Adsorption characteristics of humic acid-immobilized amine modified polyacrylamide/bentonite composite for cationic dyes in aqueous solutions. *Journal of Environmental Sciences*. 2009, **21**(7), 884-891. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62358-X. ISSN 10010742.
- [77] VLADESCU, I., O. LIELEG, S. JANG a Katharina RIBBECK. An Adsorption Chromatography Assay to Probe Bulk Particle Transport Through Hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, **101**(1), 436-442. DOI: 10.1002/jps.22737. ISSN 00223549.

- [78] KARBOWIAK, Thomas, Régis D. GOUGEON, Séverinne RIGOLET, Luc DELMOTTE, Frédéric DEBEAUFORT a Andrée VOILLEY. Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. *Food Chemistry*. 2008, **106**(4), 1340-1349. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.03.076. ISSN 03088146.
- [79] BENBETTAÏEB, Nasreddine, Mia KUREK, Salwa BORNAZ a Frédéric DEBEAUFORT. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, **94**(12), 2409-2419. DOI: 10.1002/jsfa.6570. ISSN 00225142.
- [80] SLAVUTSKY, Aníbal M. a María A. BERTUZZI. Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*. 2014, **110**, 53-61. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.03.049. ISSN 01448617.
- [81] KYZAS, George, Jie FU a Kostas MATIS. The Change from Past to Future for Adsorbent Materials in Treatment of Dyeing Wastewaters. *Materials*. 2013, **6**(11), 5131-5158. DOI: 10.3390/ma6115131. ISSN 1996-1944.
- [82] SCALLY, Shaun, William DAVISON a Hao ZHANG. Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. *Analytica Chimica Acta*. 2006, **558**(1-2), 222-229. DOI: 10.1016/j.aca.2005.11.020. ISSN 00032670.
- [83] STATHI, Panagiota a Yiannis DELIGIANNAKIS. Humic acid-inspired hybrid materials as heavy metal absorbents. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010, **351**(1), 239-247. DOI: 10.1016/j.jcis.2010.06.023. ISSN 00219797.
- [84] FATIN-ROUGE, Nicolas, Antoine MILON, Jacques BUFFLE, Richard R. GOULET a André TESSIER. Diffusion and partitioning of solutes in agarose hydrogels: The relative influence of electrostatic and specific interactions. *Journal of Physical Chemistry B*. 2003, **107**(44), 12126-12137. ISSN 15206106.
- [85] WANG, Yan, Shiming DING, Mengdan GONG, Shiwei XU, Weimin XU a Chaosheng ZHANG. Diffusion characteristics of agarose hydrogel used in diffusive gradients in thin films for measurements of cations and anions. *Analytica Chimica Acta*. 2016, **945**, 47-56. DOI: 10.1016/j.aca.2016.10.003. ISSN 00032670.
- [86] ŘEZÁČOVÁ, V., DOČEKALOVÁ, H., DOČEKAL, B. Použití techniky difúzního gradientu v tenkém filmu při charakterizaci půd. *Chemické listy*, 2005, **99**(8), s. 594-599. ISSN: 1213-7103.
- [87] DIVIŠ, P., DOČEKALOVÁ, H., ŘEZÁČOVÁ, V. Gelové techniky pro in situ měření v přírodních vodách, půdách a sedimentech. *Chemické listy*, 2005, **99**(9), s. 640. ISSN: 1213-7103.
- [88] MARTYNIUK, Halina a Jadwiga WIECKOWSKA. Adsorption of metal ions on humic acids extracted from brown coals. *Fuel Processing Technology*. 2003, **84**(1-3), 23-36. DOI: 10.1016/S0378-3820(02)00246-1. ISSN 03783820.
- [89] GOLMOHAMADI, Mahmood a Kevin J. WILKINSON. Diffusion of ions in a calcium alginate hydrogel-structure is the primary factor controlling diffusion. *Carbohydrate Polymers*. 2013, **94**(1), 82-87. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.01.046. ISSN 01448617.

- [90] HORKAY, Ferenc, Peter J. BASSER, David J. LONDONO, Anne-Marie HECHT a Erik GEISLER. Ions in hyaluronic acid solutions. *The Journal of Chemical Physics*. 2009, **131**(18), 184902-. DOI: 10.1063/1.3262308. ISSN 0021-9606.
- [91] NETTI, Paolo Antonio, M. A. Del NOBILE, Ambrosio AMBROSIO a Luigi NICOLAIS. Water Transport in Hyaluronic Acid Esters. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 1996, **11**(4), 312-327. DOI: 10.1177/088391159601100404.
- [92] POŽAR, Josip, Jasmina SALOPEK, Maja POLDRUGAČ a Davor KOVAČEVIĆ. The effect of cation type, ionic strength and temperature on the complexation between polyallylammonium cation and polystyrenesulfonate anion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2016, **510**, 159-168. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.01.039. ISSN 09277757.
- [93] YOSHIMURA, Tomokazu, Yukiko NAGATA a Kunio ESUMI. Interactions of quaternary ammonium salt-type gemini surfactants with sodium poly(styrene sulfonate). *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, **275**(2), 618-622. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.03.002. ISSN 00219797.
- [94] GUTENWIK, Jan, Bernt NILSSON a Anders AXELSSON. Determination of protein diffusion coefficients in agarose gel with a diffusion cell. *Biochemical Engineering Journal*. 2004, **19**(1), 1-7. DOI: 10.1016/j.bej.2003.09.004. ISSN 1369703x.
- [95] FALK, B., S. GARRAMONE a S. SHIVKUMAR. Diffusion coefficient of paracetamol in a chitosan hydrogel. *Materials Letters*. 2004, **58**(26), 3261-3265. DOI: 10.1016/j.matlet.2004.05.072. ISSN 0167577x.
- [96] KLUČÁKOVÁ, Martina a Miloslav PEKAŘ: Transport of copper(II) ions in humic gel - New results from diffusion couple. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2009, 349(1), 96-101. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.08.001. ISSN: 0927-775
- [97] KLUČÁKOVÁ, Martina a Michal KALINA. Diffusivity of Cu(II) ions in humic gels – influence of reactive functional groups of humic acids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015, **483**. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.05.041. ISSN 0927-7757.
- [98] SEDLÁČEK, Petr.; Jiří SMILEK; Martina KLUČÁKOVÁ: Diffusion Of Organic Dyes In Aqueous Solutions And Agarose Gels Studied By Method Of Horizontal Diffusion Cells. *Chemické listy*. Chemické listy. Brno: Czech Chemical Society, 2011, **105**(18). s.889. ISSN: 0009- 2770.
- [99] SEDLÁČEK, Petr a Martina KLUČÁKOVÁ. Simple diffusion method applied in evaluation of metal transport in model humic matrices. *Geoderma*. 2009, **153**(1-2), 11-17. DOI: 10.1016/j.geoderma.2009.07.002. ISSN 00167061.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Použité zkratky

<i>zkratka</i>	<i>význam zkratky</i>
HL	humínové látky
FK	fulvínové kyseliny
HK	humínové kyseliny
HU	huminy
Da	Dalton
ALG	alginát
M	manurát
G	guluronát
HyA	hyaluronan, kyselina hyaluronová
PSS	polystyrensulfonát
NaPSS	polystyrensulfonát sodný
CaPSS	polystyrensulfonát vápenatý
AG	agaróza
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
R6G	rhodamin 6G
FZ	Fickův zákon
FRAP	obnovení fluorescence po fotovybělení
NMR	nukleární magnetické rezonance
CNC	celulózové nanokrystaly
DGT	technika difúzního gradientu v tenkém filmu
DET	technika difúzní rovnováhy v tenkém filmu
PE	polyelektrolyt
DV	destilovaná voda
RPM	otáčky za minutu
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná (spektrofotometrie)
MS	microsoft
LVO	lineární viskoelastická oblast
PT	přímá titrace
ZT	zpětná titrace

9.2 Použité symboly

<i>symbol</i>	<i>význam</i>	<i>jednotka</i>
h	vzdálenost desek	[m]
A	plocha	[m ²]
v	rychlost	[m·s ⁻¹]
F	síla	[N]
η	dynamická viskozita	[Pa·s]
τ	tečné napětí	[Pa]
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost kapaliny	[s ⁻¹]
G'	elastický modul	[Pa]
G''	viskózní modul	[Pa]
G^*	komplexní modul	[Pa]
η^*	komplexní viskozita	[Pa·s]
δ	ztrátový úhel	[°]
t_{CR}	čas indukující počátek gelace	[s]
t_{SG}	čas indukující přechod mezi solem a gelem	[s]
E	elektroodový potenciál	[V]
E^0	standardní elektroodový potenciál	[V]
R	univerzální plynová konstanta	[J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹]
T	termodynamická teplota	[K]
F	Faradayova konstanta	[C·mol ⁻¹]
a	aktivita iontu	[mol·dm ⁻³]
J_i	difúzní tok	[mol·m ⁻² ·s ⁻¹]
D_i	difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
n_i	látkové množství difundující složky	[mol]
c_i	koncentrace difundující složky	[mol·dm ⁻³]
t	čas	[s]
c_P	koncentrace roztoku v přijímací cele	[mol·dm ⁻³]
c_Z	koncentrace roztoku ve zdrojové cele	[mol·dm ⁻³]
β	konstanta aparatury (difúzní cely)	[cm ⁻²]
ε	rozdělovací koeficient na rozhraní	[-]
V_P	celkový objem kapaliny v přijímací cele	[m ³]
V_Z	celkový objem kapaliny ve zdrojové cele	[m ³]
f	frekvence	[Hz]
D_{eff}	efektivní difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
l	tloušťka	[m]
ΔC_{10}	rozdíl koncentrace barviva v přijímací a zdrojové difúzní cele	[mol·dm ⁻³]
t_p	čas průchodu	[s]
D_a	zdánlivý difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
$V_{TČ}$	rozdíl spotřeb titračního činidla v inflexních bodech	[ml]
$c_{TČ}$	koncentrace titračního činidla	[mol·dm ⁻³]
m_{PE}	navážka polyelektrolytu	[g]
čistota_{PE}	čistota polyelektrolytu	[%]
n_{R6G}	množství nasorbovaného barviva v gelu po ukončení experimentu	[mol]
c_0	koncentrace zásobního roztoku R6G	[mol·dm ⁻³]
V	celkový objem roztoku v difúzní cele	[m ³]

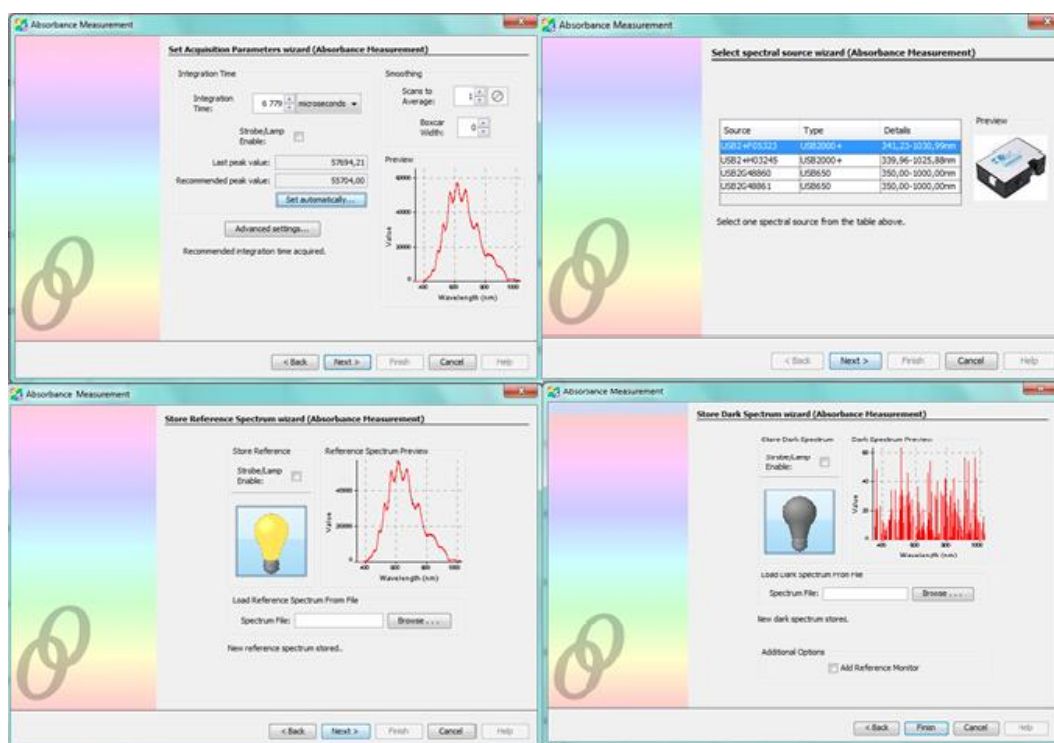
10 PŘÍLOHY



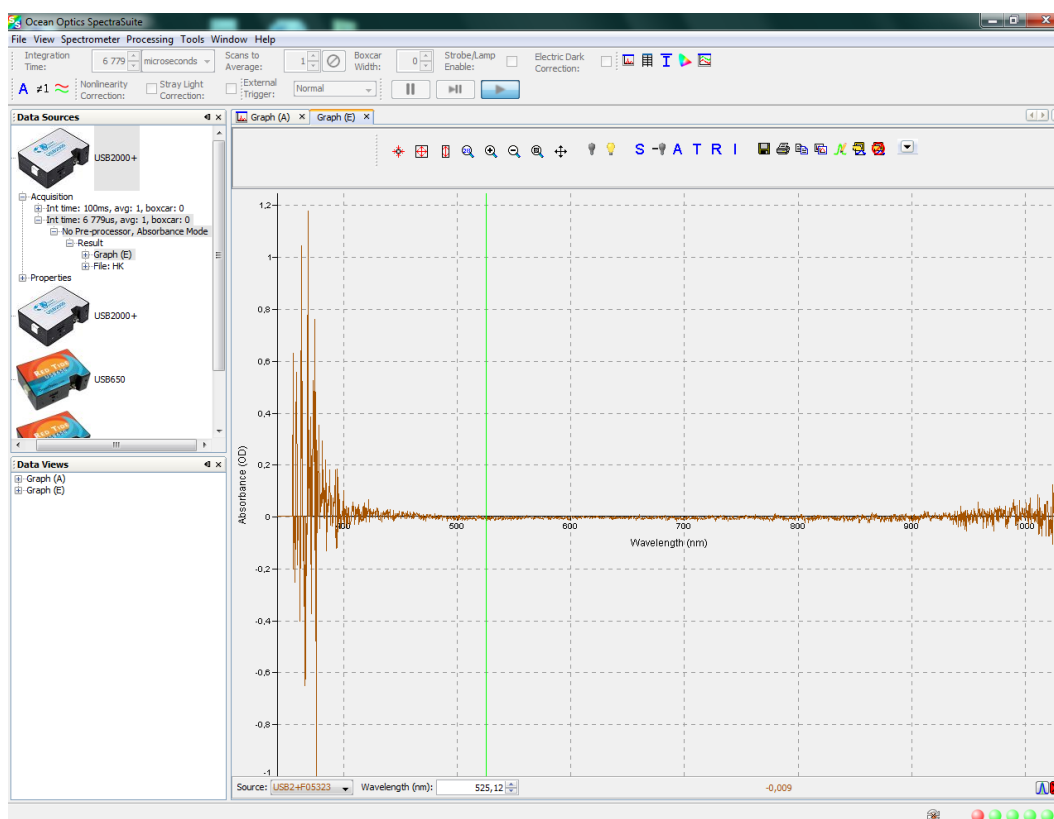
Příloha 1: Příprava agarózových hydrogelů



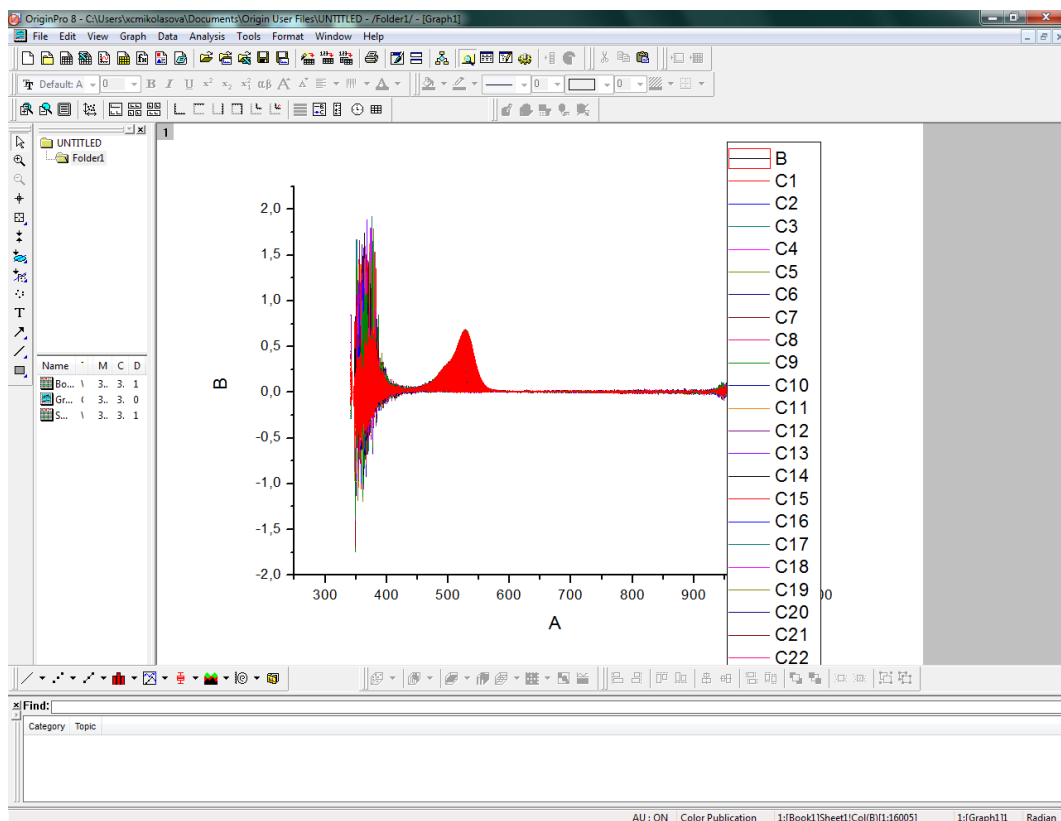
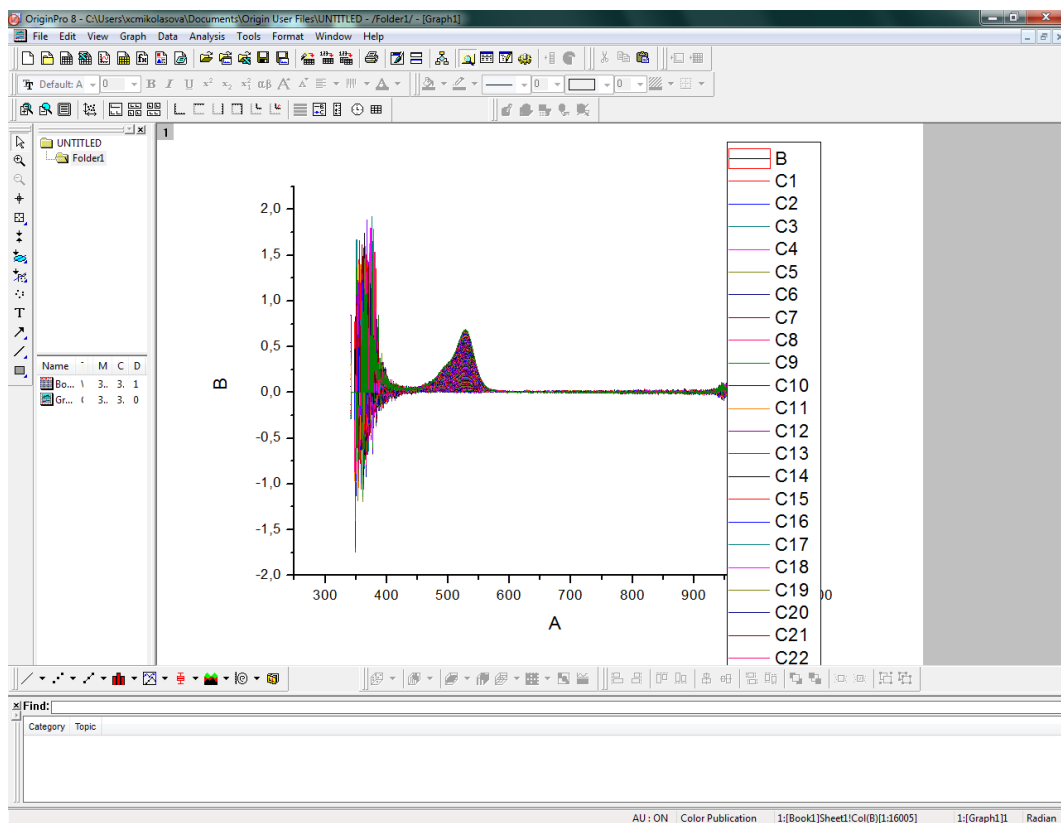
Příloha 2: Difúzní cela. Průchod R6G přes 1 hm. % agarózový gel s přidavkem 0,002 hm. % huminových kyselin

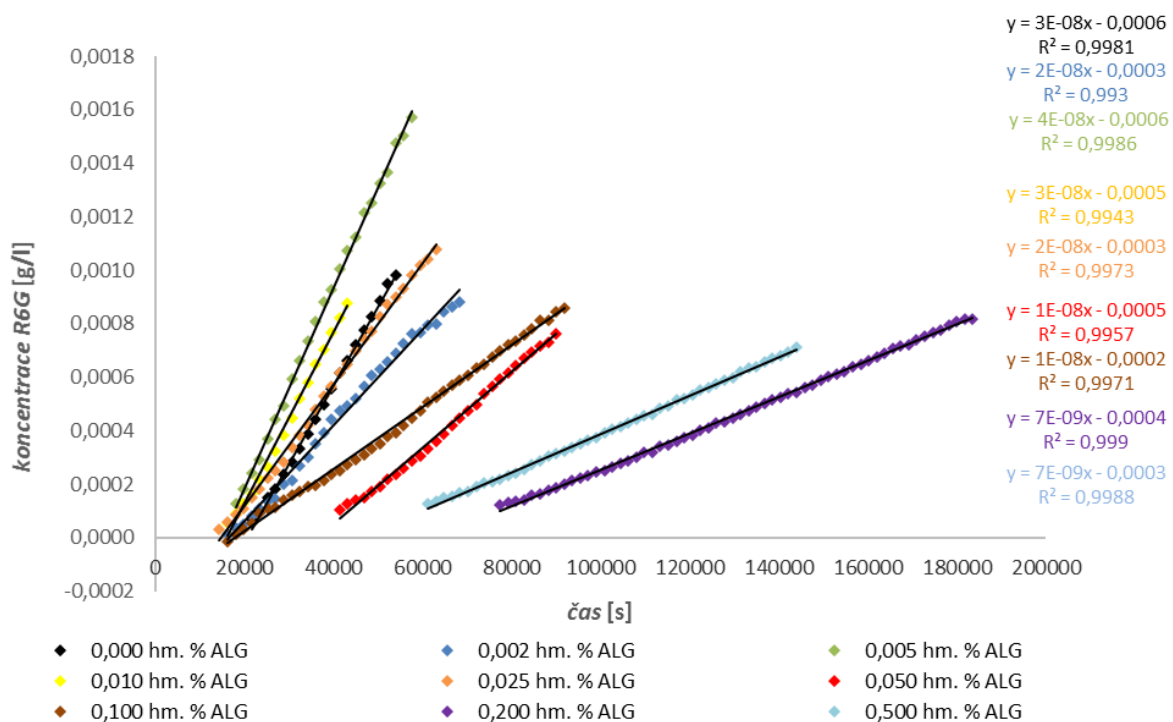


Příloha 3: Nastavení měření difúzních experimentů v programu SpectraSuite

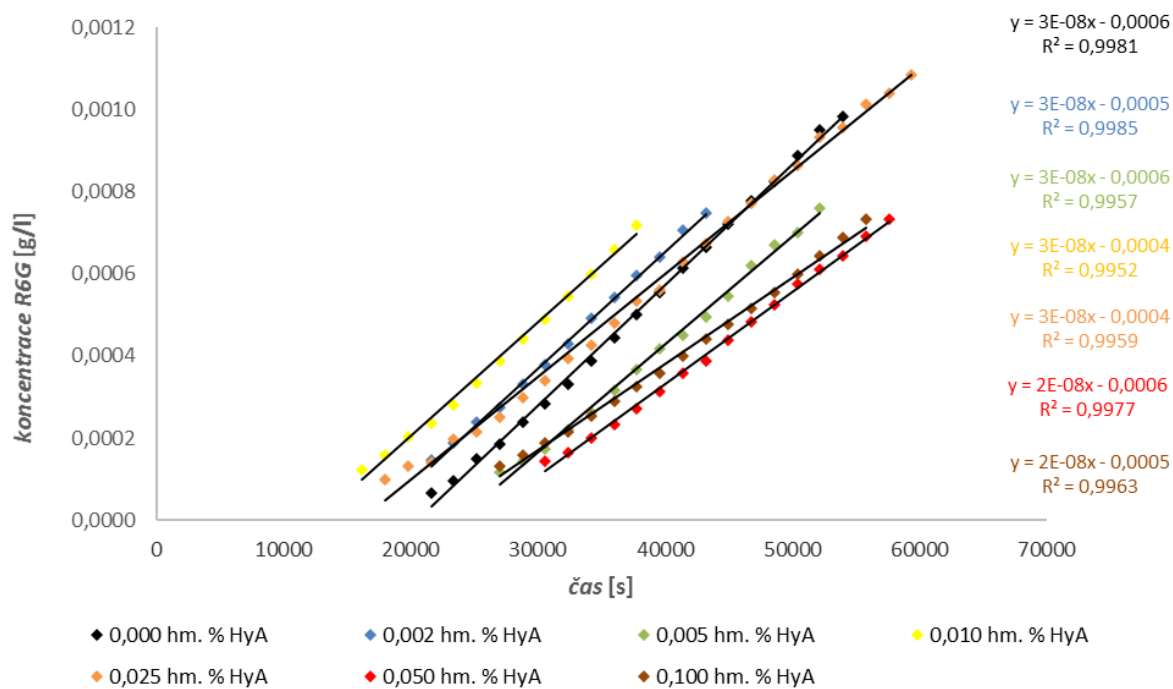


Příloha 4: Průběh měření difúzních experimentů v programu SpectraSuite

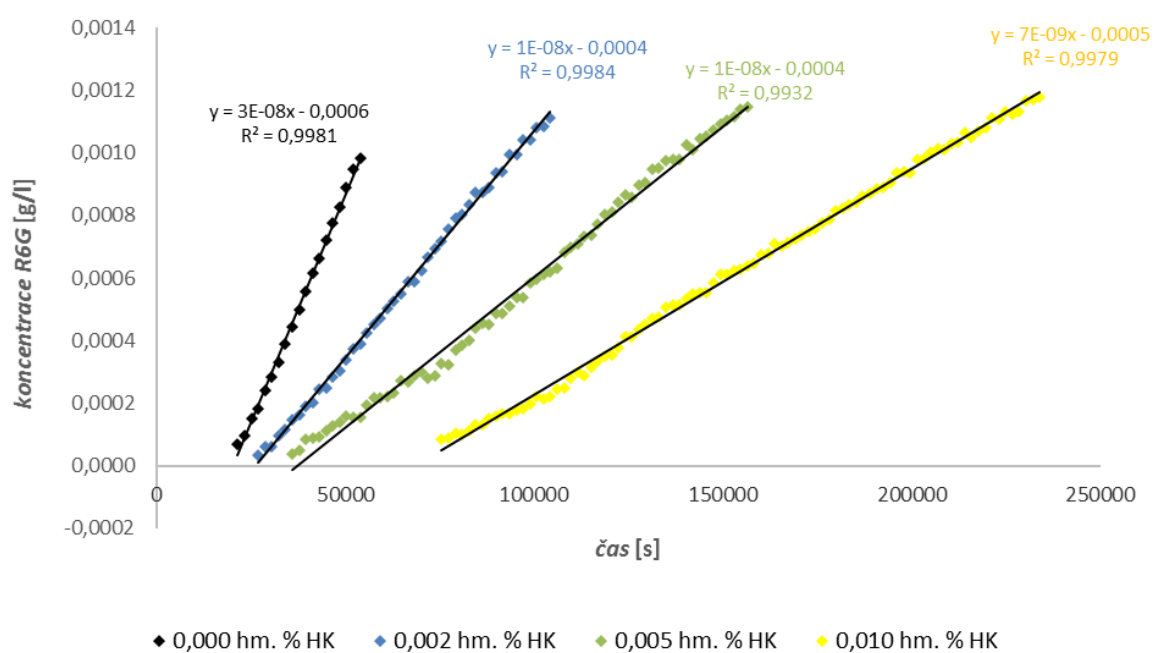




Příloha 7: Změna koncentrace RG6 v čase u 1 hm. % agarózových hydrogelů s přidavkem alginátu



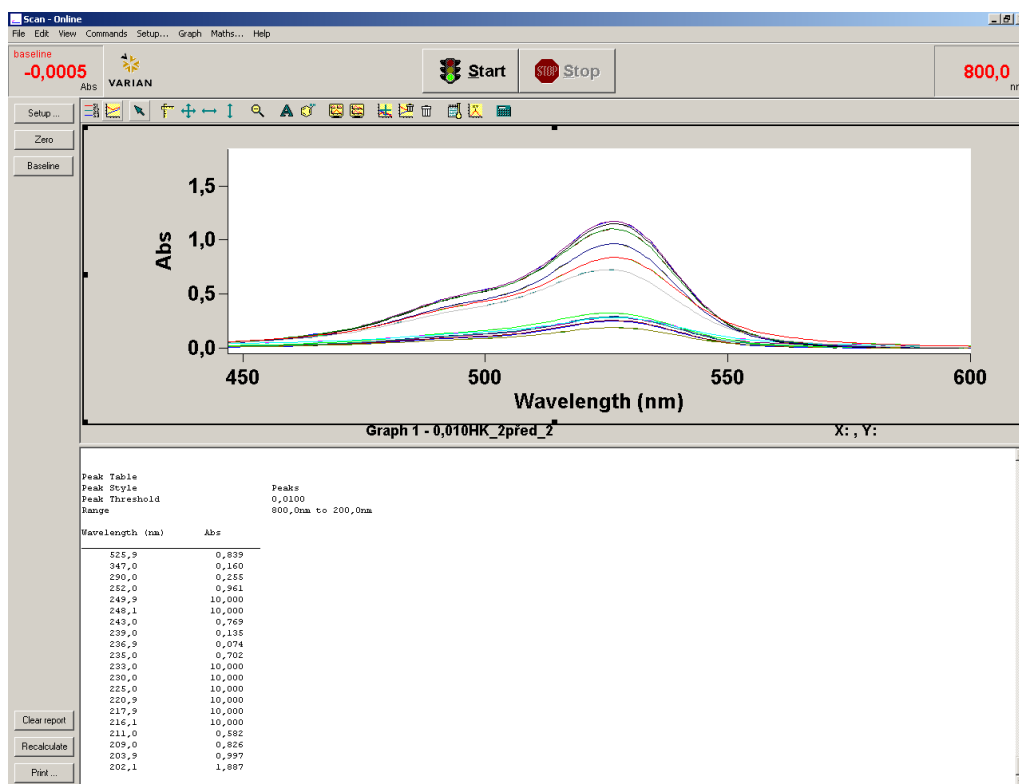
Příloha 8: Změna koncentrace RG6 v čase u 1 hm. % agarózových hydrogelů s přidavkem hyaluronanu



Příloha 9: Změna koncentrace RG6 v čase u 1 hm. % agarózových gelů s přidavkem huminových kyselin



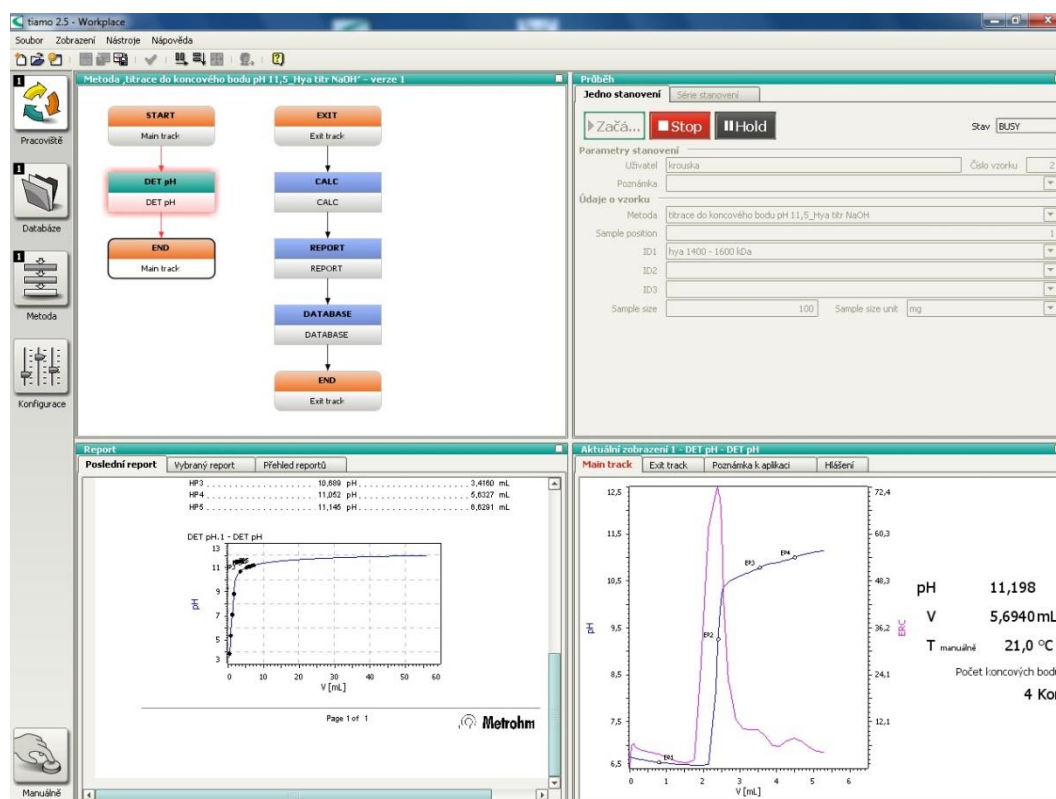
Příloha 10: Spektrofotometr VARIAN



Příloha 11: Scan - software ke spektrofotometru VARIAN



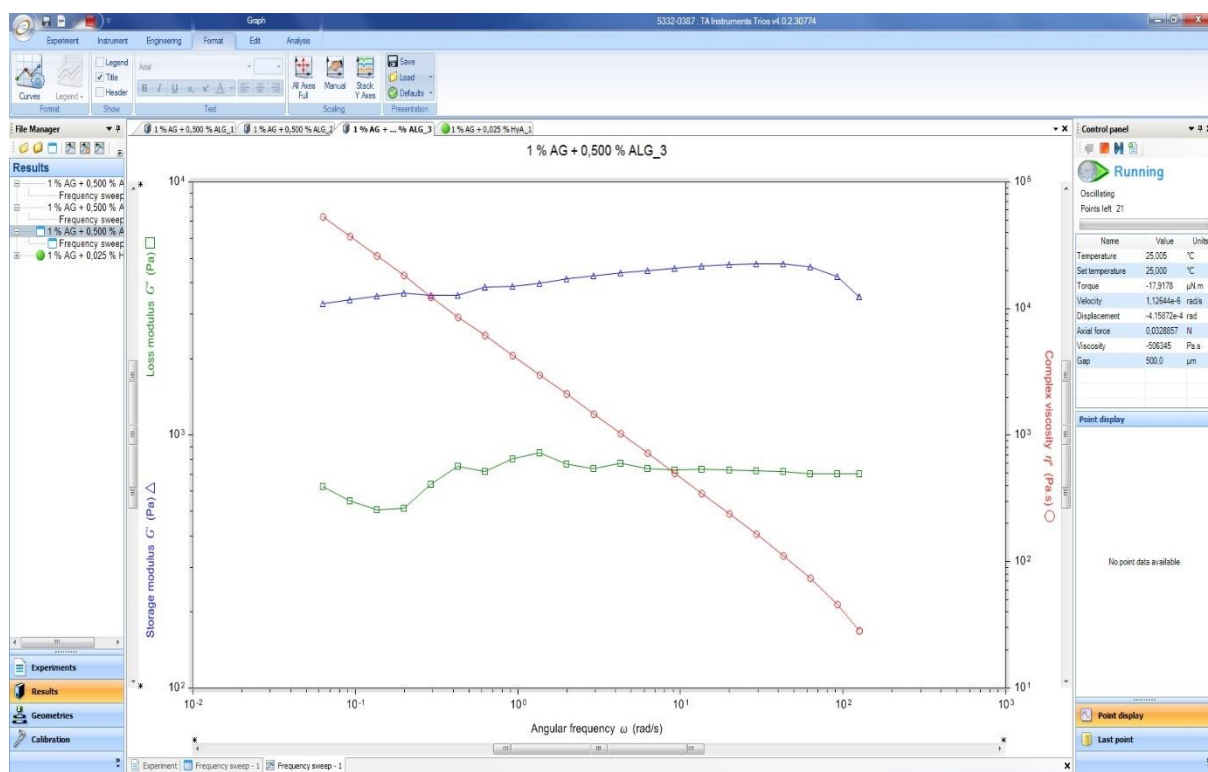
Příloha 12: Automatický titrátor Titrande 888



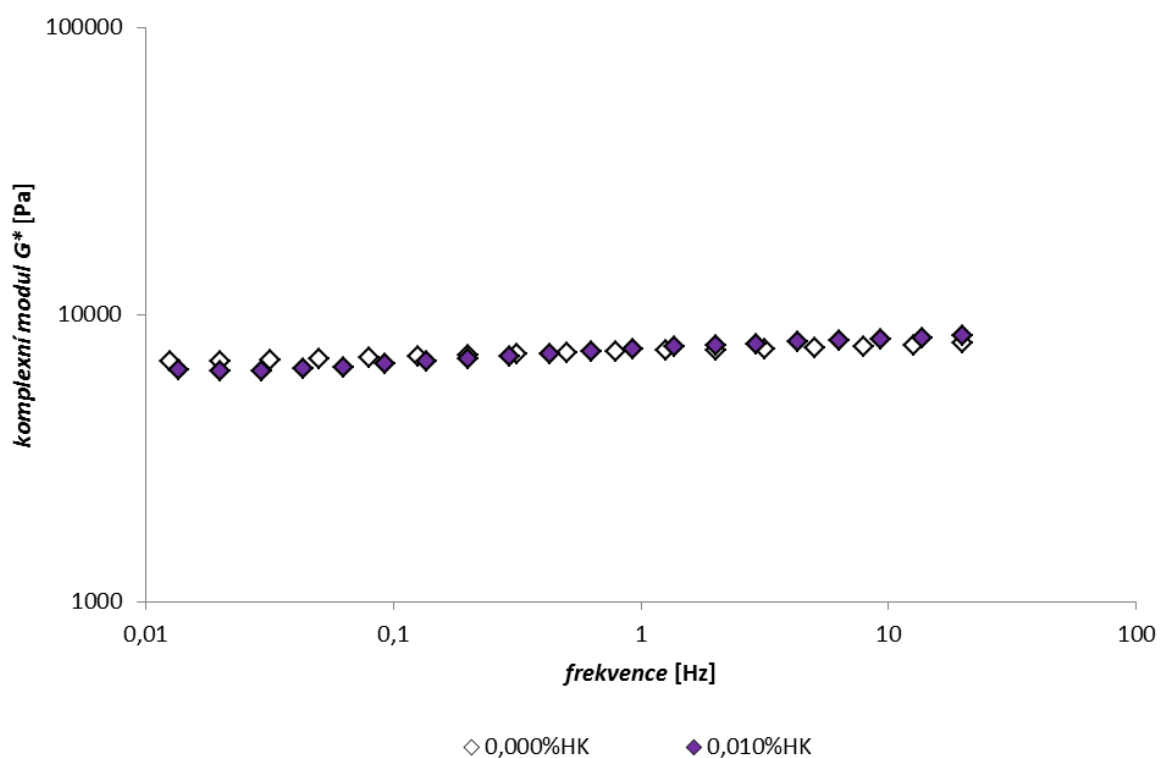
Příloha 13: Tiamo – software k automatickému titrátoru Titrando 888



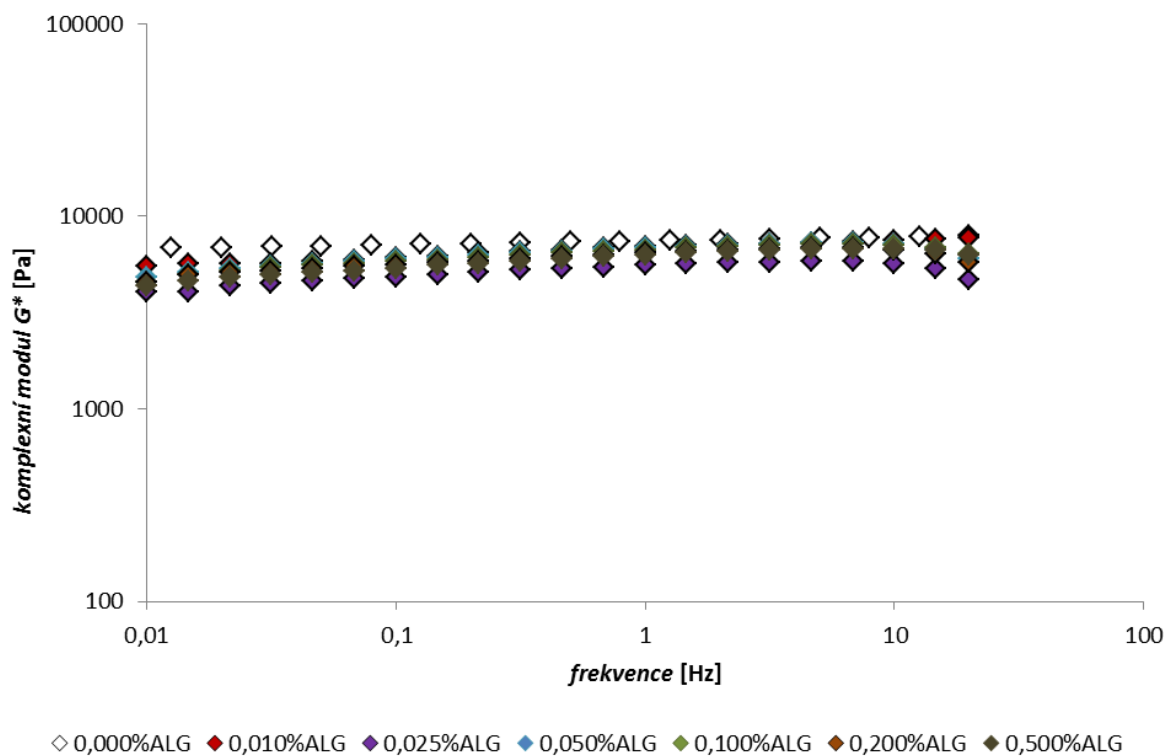
Příloha 14: Reometr HR-2



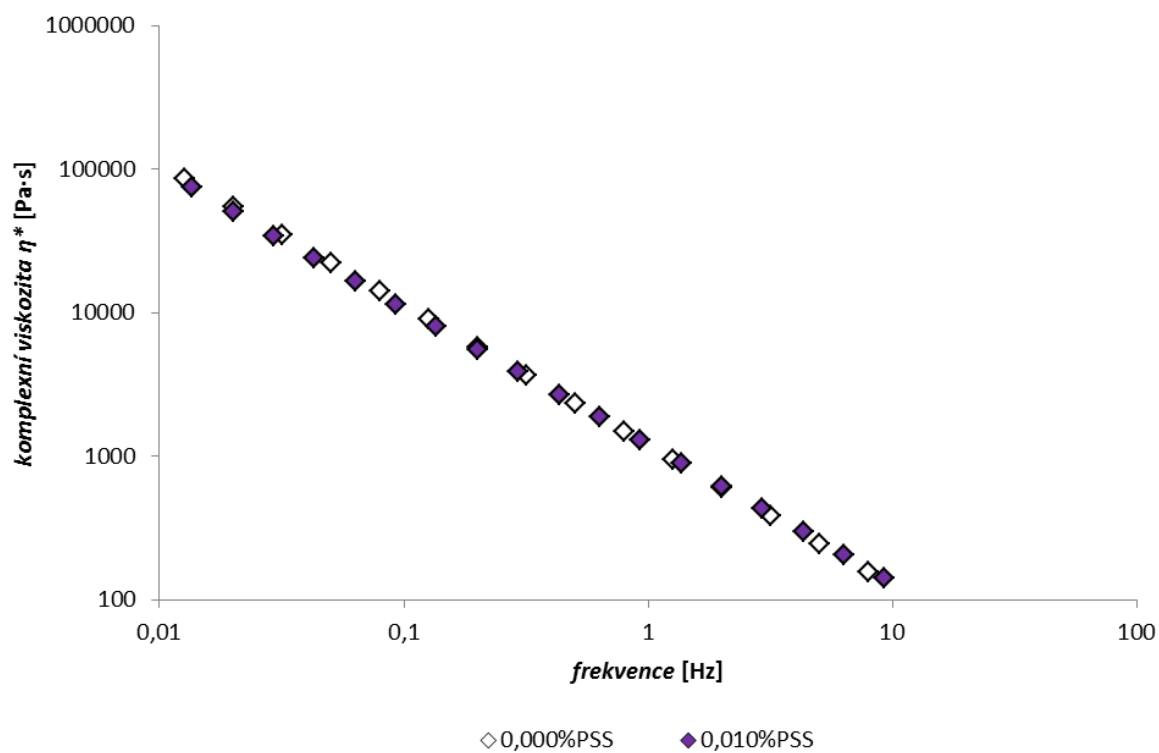
Příloha 15: Trios – software k reometru HR-2



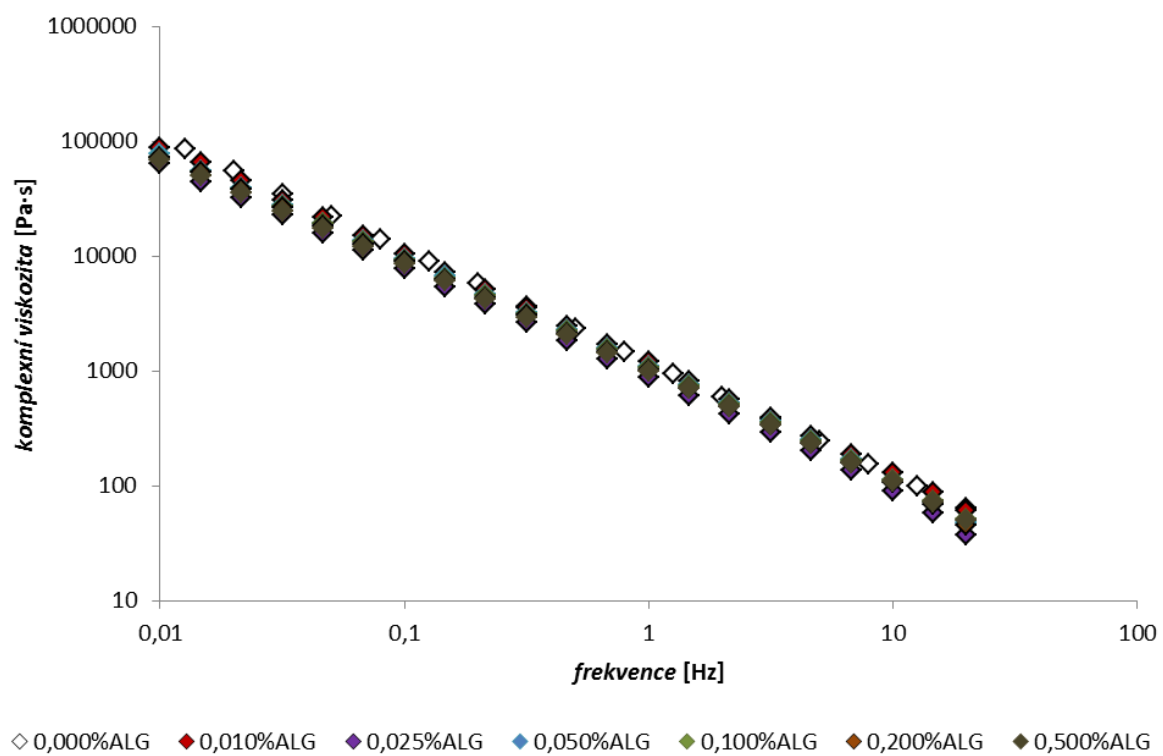
Příloha 16: Závislost komplexního modulu G^* na frekvenci oscilace pro 1 hm. % agarózové gely s různými přísadkami polystyrensulfonátu



Příloha 17: Závislost komplexního modulu G^* na frekvenci oscilace pro 1 hm. % agarózové gely s různými přídávky huminových kyselin



Příloha 18: Závislost komplexního viskozity η^* na frekvenci oscilace pro 1 hm. % agarózové gely s různými přídávky polystyren sulfonátu



Příloha 19: Závislost komplexního viskozity η^* na frekvenci oscilace pro 1 hm. % agarózové gely s různými přídávky alginátu